

**Translationsaktivatoren der mitochondrialen Cytochrom *b*-Synthese in
Saccharomyces cerevisiae:**

**Membranassoziation, Mutagenese und Protein-
Wechselwirkungen von Cbs1p**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl. Biol. Udo Krause-Buchholz

geboren am 25.11.1970 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Göttfert
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Wolfhard Bandlow

Eingereicht am:

11.07.2000

Tag der Verteidigung:

27.09.2000

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht:

Krause-Buchholz, U., Tzschoppe, K. and Rödel, G. (1999)

Translational activator proteins of cytochrome *b* synthesis: mutational analysis and characterization of interactions. *Curr Genet*, **35**, 153-487.

Tzschoppe, K., Krause-Buchholz, U. and Rödel, G. (1999)

Mutational analysis of yeast mitochondrial translational activator Cbs2p and of YHR063Cp, a protein with similarity to Cbs2p. *Curr Genet*, **36**, 201-7.

Krause-Buchholz, U., Tzschoppe, K., Paret, C., Ostermann, K. and Rödel, G. (2000)

Identification of functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translational activator Cbs1p. *Yeast*, **16**, 353-363.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS HEFE-GENOMSEQUENZIERPROJEKT	1
1.2	KERNKODIERTE MITOCHONDRIALE PROTEINE UND IHRE FUNKTIONEN	2
1.3	DIE GENEXPRESSION IN MITOCHONDRIEN.....	4
1.3.1	<i>Die Expression des COB-Genes</i>	6
1.3.2	<i>Die COB-mRNA spezifischen Translationsaktivatoren Cbs1p und Cbs2p</i>	8
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	9
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	MATERIAL.....	11
2.1.1	<i>Abkürzungen</i>	11
2.1.2	<i>Feinchemikalien</i>	13
2.1.3	<i>Enzyme</i>	13
2.1.4	<i>Antikörper</i>	14
2.1.5	<i>Oligonukleotide</i>	14
2.1.6	<i>Kit-Systeme</i>	16
2.1.7	<i>Zentrifugationen</i>	16
2.1.8	<i>Stämme</i>	17
2.1.8.1	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	17
2.1.8.2	<i>Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)</i>	17
2.1.9	<i>Vektoren & Plasmide</i>	18
2.1.10	<i>Medien</i>	18
2.1.10.1	<i>Kultivierung von E. coli</i>	18
2.1.10.2	<i>Kultivierung von S. cerevisiae</i>	19
2.1.11	<i>Puffer und Stammlösungen</i>	20
2.2	METHODEN	21
2.2.1	<i>Genetische Methoden</i>	21
2.2.1.1	<i>PET-Test</i>	21
2.2.1.2	<i>Kreuzungen von Hefestämmen für Two Hybrid-Analysen</i>	21
2.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	22

2.2.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von DNA-Molekülen.....	22
2.2.2.2 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA.....	22
2.2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	23
2.2.2.4 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	26
2.2.2.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Kulturen.....	27
2.2.2.6 Transformation von Hefezellen (Schiestl and Gietz, 1989).....	28
2.2.2.7 Präparation genomischer DNA aus Hefen (Kaiser <i>et al.</i> , 1994).....	29
2.2.2.8 Plasmid-„rescue“	30
2.2.2.9 SFH-PCR.....	30
2.2.2.10 „Overlap-Extension“-PCR	31
2.2.2.11 DNA-Hybridisierung (Southern, 1975).....	32
2.2.2.12 DNA-Sequenzierung	35
2.2.2.13 Tieftemperatur-Spektren der Cytochrome	36
2.2.2.14 Two Hybrid-System	37
2.2.3 Biochemische Methoden.....	44
2.2.3.1 Isolation von Zellorganellen.....	44
2.2.3.2 Gesamtzell-Proteinextraktion mit UREA/SDS	46
2.2.3.3 Hochsalzbehandlung und alkalische Extraktion von Proteinen (Carbonatextraktion; Fujiki <i>et al.</i> 1982).....	47
2.2.3.4 Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien.....	48
2.2.3.5 Lipasebehandlung von mitochondrialen Proteinen	48
2.2.3.6 GST-„pull-down“-Experimente	49
2.2.3.7 Proteinanalyse	51
3 ERGEBNISSE	54
3.1 REPLACEMENT DES <i>CBS1</i> -GENS	54
3.1.1 Konstruktion und molekulare Analyse des Stammes UKB1.....	55
3.1.2 Der Phänotyp des Hefestammes UKB1.....	57
3.1.3 Betrachtungen zum „questionable“ ORF YDL068w	62
3.2 ANALYSEN ZU TOPOLOGIE, LOKALISATION UND MEMBRANSTÄNDIGKEIT VON Cbs1p. 64	
3.2.1 Computergestützte Strukturanalyse des Cbs1-Proteins	64
3.2.1.1 Vorhersagen der Sekundärstruktur.....	64
3.2.1.2 Die Hydrophobizität von Cbs1p.....	65

3.2.2	<i>Untersuchungen zur Membranassoziation</i>	67
3.2.2.1	Molekularbiologische Untersuchungen.....	67
3.2.2.2	Biochemische Analysen der Membranassoziation.....	72
3.2.3	<i>Untersuchungen zur Topologie von Cbs1p</i>	84
3.3	MUTAGENESE DES <i>CBS1</i> -GENS.....	88
3.3.1	„random“-Mutagenese von <i>CBS1</i>	88
3.3.2	„directsite“-Mutagenese von <i>CBS1</i>	92
3.3.2.1	Analyse von Mutationen interner Proteinbereiche.....	92
3.3.2.2	Analyse von Mutationen im C-terminalen Bereich.....	93
3.3.2.3	Analyse von Mutationen im N-terminalen Bereich	100
3.3.2.4	Immunochemische Untersuchung zu internen Cbs1p-Importsignalen	103
3.4	ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN MIT DEM TWO HYBRID-SYSTEM.....	106
3.4.1	<i>Klonierungen für das Two Hybrid-System</i>	106
3.4.2	<i>Nachweis der Expression der Cbs1p- bzw. Cbs2p-Gal4pBD-Fusionsproteine im Two Hybrid-Stamm Y187</i>	108
3.4.3	<i>Nachweis der Expression der Fusionsproteine mit der Gal4p-Aktivator-domäne im Two Hybrid-Stamm HF7c</i>	110
3.4.4	<i>Nachweis der Kernlokalisation von Gal4pBD::<i>Cbs1p</i>-Fusionsproteinen</i>	111
3.4.5	<i>Interaktionsanalyse mittels cDNA-Bankscreening</i>	113
3.4.5.1	Herstellung einer Two Hybrid-cDNA-Bank	113
3.4.5.2	Two Hybrid-Bankscreening nach Cbs1p- bzw. Cbs2p-Interaktionspartnern	114
3.4.6	<i>Interaktionsanalyse durch direkten Test potentieller Interaktionspartner</i>	117
3.4.6.1	Etablierung eines „high-throughput“-Screeningsystems für Two Hybrid-Analysen.....	117
3.4.6.2	Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Cbs1p und Cbs2p.....	120
3.4.6.3	Test der Interaktion von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Proteinen der kleinen mitochondrialen Untereinheit	122
3.4.6.4	Test auf Interaktion von Proteinen, die mit Cbs1p bzw. Cbs2p in Beziehung stehen könnten.....	124
3.4.6.5	Interaktionsscreening der verwendeten Two Hybrid-Fusionsproteine	126
3.5	<i>IN VITRO</i> -BINDUNGSASSAYS MIT NAM1p-GST-FUSIONEN.....	130

4	DISKUSSION	133
4.1	REPLACEMENT DES <i>CBSI</i> -LESERAHMENS UND BIOINFORMATISCHE ANALYSEN VON <i>CBSI</i> UND DES ÜBERLAPPENDEN ORFs YDL068W	133
4.2	DIE MEMBRANASSOZIATION VON CBS1p	138
4.3	MUTAGENESE VON <i>CBSI</i>	148
4.3.1	<i>Mutagenese des C-terminalen Segmentes von CBSI</i>	154
4.3.2	<i>Mutagenese des N-terminalen Segmentes von CBSI</i>	156
4.4	INTERAKTIONSANALYSE MIT DEM TWO HYBRID-SYSTEM	161
4.5	<i>IN VITRO</i> -INTERAKTIONSANALYSE	167
5	ZUSAMMENFASSUNG	169
6	REFERENZEN.....	172

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Mitochondrial kodierte Untereinheiten (UE) der Atmungsketten-Komplexe und ihre spezifischen Translationsaktivatoren.....	5
Tab. 2	Zusammenstellung der an der Expression des Cytochrom <i>b</i> -Genes beteiligten Faktoren und deren Funktion.....	7
Tab. 3a	Cbs1p- und Cbs2p-Klonierungen für das Two Hybrid-System.....	38
Tab. 3b	Klonierungen für das Two Hybrid-System.....	40
Tab. 4	Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen, Temperaturen und osmotisch aktiver Substanzen auf das Wachstum der $\Delta cbs1$ -Stämme GDV0 und UKB1 sowie des wt-Stammes DBY747.....	59
Tab. 5	Übersicht zu den durch „random“- bzw. „directsite“-Mutagenese kreierte <i>cbs1</i> -Mutantenallele.....	90
Tab. 6	„directsite“-Mutagenese im C-terminalen Bereich von Cbs1p.....	93
Tab. 7	Ergebnisse des Screenings nach Cbs1p- bzw. Cbs2p-Interaktionspartnern mit Two Hybrid-cDNA-Banken.....	115
Tab. 8	Die Membranassoziation von mRNA-spezifischen mitochondrialen Translationsaktivatoren.....	138

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Darstellung der Disruption und des Replacements des <i>CBS1</i> -Gens.....	54
Abb. 2	Diagnostische PCR von Histidin-prototrophen Transformanten und Southern-Analyse des $\Delta cbs1$ -Stammes UKB1.....	56
Abb. 3	Schematische Darstellung der genomischen DNA-Region mit der Überlappungszone der Leserahmen von <i>CBS1</i> und YDL068w.....	57
Abb. 4	Tieftemperatur-Spektren der Cytochrome der <i>cbs1</i> -Nullmutanten UKB1 und GDV0 im Vergleich zum Wildtyp DBY747.....	61
Abb. 5	Schematische Darstellung des Sekundärstruktur-Consensus für Cbs1p aus den Ergebnissen verschiedener Computerprogramme.....	65
Abb. 6	Hydropathie-Plot von Cbs1p.....	66
Abb. 7	Einfluss verschiedener Deletionen im C-terminalen Bereich von Cbs1p auf die Funktionalität.....	68
Abb. 8	Komplementationsverhalten der durch Substitution der hydrophoben Bereiche von Cbs1p kreierten Proteinchimären.....	70
Abb. 9	Immunologischer Nachweis des Cbs1p-HA-Fusionsproteins.....	75
Abb. 10	Löslichkeitsverhalten von Cbs1p.....	77
Abb. 11	Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Löslichkeitsverhalten von Cbs1p.....	78
Abb. 12	Löslichkeitsverhalten von Cbs1p-Derivaten mit C-terminalen Deletionen.....	80
Abb. 13	Löslichkeitsverhalten von Cbs1p ($\Delta 193-204$)::HA nach Behandlung mit Phospholipasen.....	81
Abb. 14	Nachweis von Cbs1p (wt) bzw. C-terminal verkürzten Derivaten in <i>rho</i> ⁰ -Mitochondrien.....	82
Abb. 15	Löslichkeit von Cbs1p in <i>rho</i> ⁰ - im Vergleich zu <i>rho</i> ⁺ -Mitochondrien.....	83
Abb. 16	Topologie von Cbs1p und Cbs1p $\Delta(193-204)$	86
Abb. 17	Komplementationsverhalten von <i>cbs1</i> -Allelen mit C-terminalen Mutationen.....	95
Abb. 18	Auswirkungen C-terminaler Deletionen von Cbs1p auf die Konzentration von Untereinheiten der Komplexe III und IV.....	97
Abb. 19	Komplementationsverhalten von N-terminal verkürztem Cbs1p in Abhängigkeit von der Expressionsstärke.....	102

Abb. 20	Lokalisierung von Gal4pBD und Gal4pBD-Fusionen mit unterschiedlichen Proteinanteilen von Cbs1p.....	104
Abb. 21	Schematische Darstellung der verwendeten Two Hybrid-Fusionsproteine mit Cbs1p bzw. Cbs2p.....	107
Abb. 22	Nachweis der Expression der Gal4pBD-Fusionen mit Cbs1p bzw. Cbs2p und deren Derivate.....	109
Abb. 23	Nachweis der Expression von Gal4pAD-Fusionsproteinen im Stamm HF7c..	110
Abb. 24	Nachweis der Kernlokalisierung von Gal4pBD-Fusionen.....	112
Abb. 25	Test auf Interaktion zwischen Cbs1p und Cbs2p.....	120
Abb. 26	Test auf Interaktion von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Proteinen der kleinen mitochondrialen Untereinheit.....	123
Abb. 27	Test auf Interaktion von Cbs1p bzw. Cbs2p mit potentiellen Interaktionskandidaten.....	125
Abb. 28	Two Hybrid-Interaktionsscreening.....	127
Abb. 29	Quantitativer β -Galaktosidase-Assay.....	128
Abb. 30	Expression und Aufreinigung von GST::Nam1p(16-440)	130
Abb. 31	<i>In vitro</i> -Bindungsassays mit GST::Nam1p gekoppelter Sepharose.....	131
Abb. 32	Sequenz-Alignments von Cbs1p mit eIF-2B bzw. der RNP1- und RNP2-Konsensus-Sequenz.....	151
Abb. 33	Homologievergleich von Cbs1p (As 178-212) und Cbt1p (As 200-224)	153
Abb. 34	Vergleich der Hydropathie-Profile von Cbs1p und Cbt1p.....	154
Abb. 35	„Helical-wheel“-Projektion der As 30-44 von Cbs1p.....	159
Abb. 36	Modell der Funktionsweise von Cbs1p und Cbs2p.....	170

1 Einleitung

Die Bäcker- oder Bierhefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* wird dank ihres breiten Spektrums ökophysiologischer Leistungen in vielfältigen Produktionsprozessen der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Durch die einfache Kultivierbarkeit und die mikroskopische Beobachtbarkeit hielt die Hefe schon frühzeitig Einzug in die Forschung. Waren es zunächst, beginnend mit der Beschreibung durch L. Pasteur im 19. Jahrhundert, vor allem Untersuchungen zur Morphologie dieses eukaryontischen Einzellens, so folgten stoffwechselphysiologische Analysen, die diese Hefe inzwischen zu einem sehr ausführlich charakterisierten Organismus werden ließ. Darauf aufbauend, erwies sich die Bäckerhefe als ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt für genetische und molekularbiologische Fragestellungen. Mit der Definition eines geeigneten Ausgangsstammes von *S. cerevisiae* (Lindgren *et al.*, 1965) wurde der Grundstein für die genetischen und molekularbiologischen Arbeiten an *S. cerevisiae* als Modellsystem für eukaryontische Zellen gelegt. Aus diesen Gründen wurde auch das Genom von *S. cerevisiae* für die erste komplette DNA-Sequenzierung eines eukaryontischen Genoms ausgewählt.

1.1 Das Hefe-Genomsequenzierprojekt

Seit April 1996 liegt die komplette DNA-Sequenz von *S. cerevisiae* vor (Cherry *et al.*, 1997). Das Genom von *S. cerevisiae* ist in Form von 16 Chromosomen organisiert, deren Gesamtlänge über 13 Millionen Basenpaare umfasst. Insgesamt wurden 6357 offene Leserahmen („open reading frame“, ORF) ermittelt (Stand 06/2000). Davon kodieren etwa die Hälfte (3199 ORFs) für Proteine bekannter Funktion und weitere 1117 ORFs für Proteine mit starker Homologie (248 ORFs) bzw. schwacher Homologie (869 ORFs) zu bereits bekannten Proteinen aus anderen Organismen. Die übrigen Leserahmen zeigen Homologien zu Proteinen unbekannter Funktion (789 ORFs), keine Homologien (805 ORFs) oder werden als „questionable“ ORFs klassifiziert (447 ORFs). Darüber hinaus kodiert das nukleäre Genom für 275 tRNA Gene und 80 Gene für snRNA.

Wie fast alle eukaryontischen Organismen besitzt auch die Hefe ein extranukleäres Genom in den Mitochondrien. Die bis vor kurzem verfügbare mitochondriale DNA (mtDNA)-Sequenz leitete sich von verschiedenen Hefestämmen ab und enthielt deshalb viele stammabhängige Sequenzvariationen. Mit der kompletten Sequenzierung der mtDNA des Stammes, der auch für die Sequenzierung des nukleären Genoms verwendet wurde, steht nun eine einheitliche Sequenzreferenz für Analysen der mtDNA von *S. cerevisiae* zur Verfügung (Foury *et al.*, 1998). Die Sequenzierung ergab eine Gesamtlänge der zirkulären mtDNA von 85779 Basenpaaren. 19 ORFs, die für 11 bekannte und 8 hypothetische Proteine kodieren (zusätzlich eines „questionable“ ORFs), wurden identifiziert. Zu den ORFs, die für bekannte Genprodukte kodieren, gehören die der 3 Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase (Cox1p, Cox2p, Cox3p), einer Untereinheit (Apocytochrom *b*) von Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase) der Atmungskette sowie der Untereinheiten 6, 8 und 9 der ATPase (Oli2p, Aap1p, Oli1p). Des weiteren wurden 3 Leserahmen identifiziert, die für DNA Endonucleasen kodieren (*SCEI*, *SCEII*, *SCEIII*). Interessanterweise wird nur ein einziges mitoribosomales Protein, Var1p, vom mitochondrialen Genom bereitgestellt.

1.2 Kernkodierte mitochondriale Proteine und ihre Funktionen

Dieser überschaubaren Anzahl von mitochondrial kodierten Proteinen stehen wenigstens 332 bislang identifizierte kernkodierte Proteine gegenüber (MITBASE, 06/2000), deren Ziel- und Wirkort die Mitochondrien sind. Dazu zählen Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette, der ATPase, der Transkriptions-, Translations- und Spleißmaschinerie, Chaperone sowie zahlreiche Enzyme wichtiger Stoffwechselwege (z.B. Fettsäureoxidation, Aminosäureabbau) und Transportproteine für Stoffwechselintermediate (z.B. Citrat, FAD) und Ionen (z.B. Eisen, Kupfer, Kalzium). Aus dieser Gegenüberstellung wird deutlich, dass die Biogenese von Mitochondrien, insbesondere die Assemblierung der Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung, ein hohes Maß an Koordination und Regulation der Expression der beiden Genome verlangt.

Dabei verläuft die Informationsleitung nicht nur vom Kern (bzw. Cytosol) zum Mitochondrium, sondern auch umgekehrt werden Signale über den energetischen und metabolischen Zustand der Mitochondrien transportiert (retrograde Regulation, (Liao *et al.*, 1991; Sekito *et al.*, 2000)).

Die regulatorische Funktion der Mitochondrien für die gesamte Zelle wird bei der Synthese von Eisen-Schwefelclustern im Cytosol deutlich (Lill *et al.*, 1999). Offensichtlich übernimmt hier das Mitochondrium die Koordinierung des Eisenhaushaltes der Zelle. Diese und weitere Befunde verlangen nach einer Korrektur der Meinung, Mitochondrien existierten im „Schatten“ des Zellkerns. Vielmehr wird deutlich, dass bei essentiellen Prozessen der Zelle, ja selbst beim programmierten Zelltod (Apoptose, (Shimizu *et al.*, 1999)) die Mitochondrien eine zentrale Rolle spielen. Die Gewinnung von ATP für den Energiehaushalt der Zelle gehört zu einer der wichtigsten Funktionen der Mitochondrien. Die ATP Synthese erfordert einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran, der durch den Elektronentransport innerhalb der Atmungskette bewirkt wird.

Die Atmungskette besteht aus mehreren Enzymkomplexen, die in die innere Mitochondrienmembran eingelagert sind. Diese Komplexe werden durch kleinere Komponenten (Ubiquinon, Cytochrom *c*) elektrochemisch verbunden. In Hefe verhalten sich die Komponenten der Atmungskette nicht als lateral in der Membran frei bewegliche unabhängige Komplexe, sondern bilden eine gesamte Einheit (Boumans *et al.*, 1998). Kürzlich konnte experimentell auch belegt werden, dass die Komplexe III und IV der Atmungskette als „supra-Komplexe“ vorliegen (Cruciat *et al.*, 2000). Diese Art der Organisation der Atmungskomplexe könnte die Möglichkeit eröffnen, sich schneller auf wechselnde Substratbedingungen einzustellen. Umweltparameter, die eine Adaptation der Mitochondrien verlangen, sind die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen und Sauerstoff. In Zellen, die auf Medien mit hoher Glucosekonzentration wachsen, verhindert das Überangebot an glycolytisch gebildetem ATP die Snf1p-Snf4p Proteinkinasen-abhängige Phosphorylierung von Mig1p (De Vit *et al.*, 1997). Dephosphoryliertes Mig1p wandert aus dem Cytoplasma in den Kern und vermittelt dort die als Glucoserepression bekannte Blockierung der Expression einer Reihe von Genen, welche für Proteine kodieren, die an der

oxidativen Phosphorylierung beteiligt oder für die Aufnahme anderer Zucker verantwortlich sind.

Einige kernkodierte Gene, deren Produkte essentiell für die Aufrechterhaltung der Atmungsfunktion des Mitochondriums sind (*PET*-Gene), besitzen in ihren 5'-seitig gelegenen Bereichen Bindestellen für Proteine der Hap-Familie. Hap1p bindet erst im Komplex mit Häm, dessen Biosynthese einen sauerstoffabhängigen Schritt enthält, an die entsprechenden DNA Sequenzen und aktiviert die Transkription nachgeschalteter Gene (Creusot *et al.*, 1988). Damit fungiert das Hap1p/Häm System als Sensor für die Verfügbarkeit von Sauerstoff. Auf nicht-fermentierbaren Medien wird die Transkription wichtiger mitochondrialer Proteine durch die Bindung eines Hap2p/Hap3p/Hap4p Komplexes aktiviert (Liu and Butow, 1999; Rosenkrantz *et al.*, 1994).

1.3 Die Genexpression in Mitochondrien

Mitochondrien werden im allgemeinen - der Endosymbiontentheorie folgend - als Abkömmlinge prokaryontischer Zellen angesehen (Gray, 1993; Müller and Martin, 1999). Ihr Expressionssystem zeigt allerdings kaum Übereinstimmung zu dem der Bakterien. So besitzen die Mitochondrien zwar einen Spezifitätsfaktor für die Transkription, der an die bakterielle Sigma-Untereinheit erinnert, aber die mitochondriale katalytische Transkriptase von Hefe besteht - wie die von T3 und T7 Phagen - nur aus einer einzigen Untereinheit (Masters *et al.*, 1987). Außerdem wird die Translation in Hefe-Mitochondrien nicht über eine Shine-Dalgarno-Paarung zwischen mRNA und srRNA eingeleitet, wie sie für Bakterien bekannt ist. Interessanterweise zeigt nur etwa die Hälfte der identifizierten ribosomalen Proteine der Hefe-Mitochondrien Homologien zu bakteriellen Proteinen (Grohmann *et al.*, 1994). Auch die Insertion der mitochondrialen Translationsprodukte in und der Transport polarer Domänen durch die innere Membran erfolgt offenbar nicht über ein dem *sec*-System der Eubakterien homologes System (Fox, 1996).

Die spezifische Regulation nukleärer Gene erfolgt eher auf der Ebene der Transkription, wobei die Translation durch generelle Translationsfaktoren reguliert wird. Im Gegensatz dazu benötigen mitochondriale mRNAs der Hefe genspezifische Translationsfaktoren. Bisher konnte für die Translation von fünf der sieben

mitochondrial kodierten Membranproteine eine Beteiligung von genspezifischen Translationsaktivatoren nachgewiesen werden (Tab. 1). Die Spezifität wird dabei durch die 5'-Leader der entsprechenden mRNAs definiert (Müller and Fox, 1984; Rödel, 1986). Eine Substitution der Leader (Leader-Rearrangement) bringt die Expression des neu fusionierten chimären Gens unter die Kontrolle der spezifischen Translationsfaktoren des Ursprungsgens. Der Nachweis der Assoziation dieser Faktoren mit der inneren Mitochondrienmembran (Michaelis *et al.*, 1991; McMullin and Fox, 1993) impliziert, dass die Translation der stark hydrophoben mitochondrialen Proteine erst eingeleitet wird, wenn die mRNA-beladenen Ribosomen in Kontakt mit der Membran getreten sind. Dadurch wird eine co-translationale Insertion der nascierenden Polypeptidkette in die Membran gewährleistet. Interessanterweise wurden bisher noch keine Proteine identifiziert, die spezifisch die Translation des einzigen mitochondrial kodierten ribosomalen Proteins Var1p betreffen. Dies könnte ein Hinweis auf eine andere Art der Translationsregulation sein.

Gen	Protein	Spezifische Translationsfaktoren	Quelle
COB	Apocytochrom <i>b</i>	Cbs1p, Cbs2p, Cbp6p	(Rödel <i>et al.</i> , 1986) (Dieckmann and Tzagoloff, 1985)
COX1	Cytochrom c-Oxidase UE 1	Pet309p, Mss51p	(Manthey and McEwen, 1995) (Siep <i>et al.</i> , 2000)
COX2	Cytochrom c-Oxidase UE 2	Pet111p	(Poutre and Fox, 1987)
COX3	Cytochrom c-Oxidase UE 3	Pet54p, Pet122p, Pet494p	(Costanzo and Fox, 1988)
ATP6	ATP Synthase UE 6	?	
ATP8	ATP Synthase UE 8	?	
ATP9	ATP Synthase UE 9	Aep1p Aep2p	(Payne <i>et al.</i> , 1993) (Finnegan <i>et al.</i> , 1995)

Tab. 1: Mitochondrial kodierte Untereinheiten (UE) der Atmungsketten-Komplexe und ihre spezifischen Translationsaktivatoren

1.3.1 Die Expression des *COB*-Genes

Zu den am besten charakterisierten mitochondrialen Genen von Hefe gehört das *COB*-Gen, dass für Apocytochrom *b*, die einzige mitochondrial kodierte Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette, kodiert. Die mRNA dieses Genes verfügt über einen ungewöhnlich langen 5'-Leader von über 950 Basen. Das *COB*-Gen enthält stammabhängig bis zu fünf Introns, deren sequenzielles Spleißen aus dem Primärtranskript entweder autokatalytisch (Intron *bI1* und *bI5*) oder abhängig von der entsprechenden intronkodierten Maturase erfolgt (Labouesse *et al.*, 1984).

Damit komplexiert sich das oben dargestellte Modell der membranständigen Translation um den Fakt, dass auch die Spleißmaschinerie parallel in diesen Prozess eingreifen muss, da auch intermediäre Transkripte erst translatiert werden müssen, um die entsprechende Maturase für die weiteren Spleißschritte bereitzustellen. Die Expression von Apocytochrom *b* hängt von einer Reihe zum Teil genspezifischer Faktoren ab (Tab. 2). So sind an der Translation des *COB*-Transkripts mindestens drei genspezifische Faktoren beteiligt: Cbs1p, Cbs2p (Cytochrom b Synthese, (Rödel *et al.*, 1986)), die Gegenstand dieser Arbeit sind, und Cbp6p (Dieckmann and Tzagoloff, 1985). Während der Ausfall von Cbs1p und/oder Cbs2p, der zur Anreicherung von ungespleißter *COB*-mRNA führt (Pillar *et al.*, 1983), durch die schon beschriebenen Leader-Rearrangements supprimiert werden kann (Rödel, 1986), ist der Funktionsausfall von Cbp6p dadurch nicht zu heilen. Dies deutet darauf hin, dass Cbp6p in einem anderen Kontext die Translation von Cytochrom *b* beeinflusst (Tzagoloff *et al.*, 1988). Durch Deletionsanalysen konnten die Bereiche des 5'-Leaders der *COB*-mRNA identifiziert werden, die für eine Cbs1p- und Cbs2p-abhängige Expression notwendig sind. Diese direkten oder indirekten Targetsites liegen zwischen den Basenpaaren -170 bis -104 oder/und -60 bis +1 (bezüglich Start A[+1]TG des *COB*-Leserahmens) (Mittelmeier and Dieckmann, 1995).

Protein	Funktionen im Rahmen der <i>COB</i> -Expression	Mutantenphänotyp Beschreibung der molekularen Wirkmechanismen
Cbs1p	Translation	- Mutationen führen zur Akkumulation intronhaltiger prä-mRNA und zum Ausfall von Cytochrom <i>b</i> - aktiviert die Translation durch direkte oder indirekte Interaktion mit dem <i>COB</i> -Leader
Cbs2p	Translation	- <i>cbs2</i> -Mutanten verhalten sich phänotypisch wie <i>cbs1</i> -Mutanten - Funktionsweise wie bei Cbs1p
Cbp6p	Translation	- in der Nullmutante wird reife <i>COB</i> -mRNA in vergleichbaren Konzentrationen wie beim Wildtyp akkumuliert, aber nicht translatiert - der Defekt kann nicht durch Rearrangements des <i>COB</i> -Leaders supprimiert werden
Cbp1p	Prozessierung und Stabilität der mRNA	- für die Stabilität der <i>COB</i> prä-mRNA benötigt, wenn durch Abspaltung der Glutamyl-tRNA das 5'-seitige Transkriptende gebildet wird
Nam1p	Transkriptreifung und -stabilität	- <i>nam1</i> -Mutationen führen zur drastischen Reduktion der Konzentration von <i>COB</i> - und <i>COX1</i> -Transkripten in Stämmen mit intronhaltiger mtDNA
Cbp2	Transkriptreifung	- in <i>cbp2</i> -Stämmen wird das <i>bl5</i> -Intron nicht gespleißt (andere Gruppe I Introns sind nicht betroffen)
Cbt1p	Prozessierung	- beteiligt an der Bildung des 3'-seitigen Transkriptendes
Mrs1p	Transkriptreifung	- essentiell für die Excision des <i>bl3</i> <i>COB</i> - und des <i>al6</i> <i>COX1</i> -Introns
Mss116p	Transkriptreifung	- benötigt für das Spleißen der Gruppe II Introns der <i>COB</i> und <i>COX1</i> prä-mRNA
Nam2p	Transkriptreifung	- wichtig für das Spleißen der <i>bl4</i> - und <i>al4</i> -Introns der <i>COB</i> bzw. <i>COX1</i> prä-mRNA

Tab. 2: **Zusammenstellung der an der Expression des Cytochrom *b*-Genes beteiligten Faktoren und deren Funktion** (nach Costanzo *et al.*, 2000b)

1.3.2 Die *COB*-mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren Cbs1p und Cbs2p

In einem Screening atmungsdefekter Hefen wurden 5 nucleäre Mutanten unterschiedlicher Komplementationsgruppen identifiziert, bei denen es zur Akkumulation ungespleißter *COB* prä-mRNA kommt (Pillar *et al.*, 1983). Zwei dieser Mutanten (MK2 mit dem *cbs1-1* Allel und MK6 mit dem *cbs2-1* Allel) reicherten bei Vorhandensein des „langen“ *COB*-Genes (mit 5 Introns) prä-mRNA an, die noch die Introns *bl2*, *bl3* und *bl4* enthielten. Ein intronfreies *COB*-Gen hingegen führt zu einer reifen mRNA; trotzdem konnte aber kein Translationsprodukt nachgewiesen werden. Damit liegt der primäre Effekt beider Mutantenallele in der Blockierung der Translation des Apocytochrom *b* (Rödel, 1986). Der Spleißdefekt ist also sekundärer Natur und resultiert aus der Notwendigkeit der Translation intermediärer mRNAs, um die intronkodierten Maturasen zu exprimieren (s. 1.3.1). Die Gene *CBS1* und *CBS2* wurden durch Komplementation des Atmungsdefektes der entsprechenden Mutanten aus einer Wildtyp-Genbank isoliert (Rödel *et al.*, 1986).

Das *CBS1*-Gen liegt auf Chromosom IV und kodiert für ein 27 kDa Precursorprotein. Es besitzt eine 29 Aminosäuren umfassende N-terminale Präsequenz, die beim Import in die Mitochondrien abgespalten wird (Körte *et al.*, 1989). Im Leseraster von *CBS1* sind „minore“ Codons leicht bevorzugt, was in einem negativen Codon Bias Index von -0,02 zum Ausdruck kommt. Für eine sehr geringe Expression des Cbs1p spricht auch die niedrige Konzentration der *CBS1*-mRNA in der Zelle (Forsbach *et al.*, 1989). Möglicherweise sind das Hinweise darauf, dass Cbs1p in regulatorische Funktionen involviert ist. Die Expression von Cbs1p wird durch Glucose oder anaerobe Wachstumsbedingungen reprimiert (Forsbach *et al.*, 1989). Andererseits konnte im Rahmen der genomweiten Expressionsanalyse auf der Basis von cDNA-Arrays (DeRisi *et al.*, 1997) keine Zunahme der Expression von *CBS1* nachgewiesen werden, wenn es im Verlauf des Wachstums der Hefen in Glucosemedium zum Absinken der Glucosekonzentration und damit letztlich zur Aufhebung der Glucose-vermittelten Repression (Derepression) kam.

Der *CBS2*-Leserahmen befindet sich ebenfalls auf Chromosom IV. Das 45 kDa Cbs2p wird ohne erkennbare Prozessierung in die Mitochondrien transportiert (Michaelis and Rödel, 1990).

Während sich Cbs2p bei der Behandlung mit Taurodeoxycholat wie ein über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Membran assoziiertes Protein verhält, wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen Cbs1p als integrales Membranprotein identifiziert (Michaelis *et al.*, 1991). Damit stellt Cbs1p einen möglichen Partner dar, der die Membranständigkeit COB-mRNA beladener Ribosomen vermittelt. Die Lokalisierung in der inneren Membran konnte auch für andere mRNA-spezifische Translationsaktivatoren gezeigt werden (Pet494p, Pet122p, Pet54p, (McMullin and Fox, 1993)). Unklarheit besteht noch über die Art der Membranassoziation von Cbs1p. Einerseits verhält sich Cbs1p, wie oben beschrieben, als integrales Membranprotein, andererseits wird der Hauptanteil an *in vitro* in Mitochondrien importiertem Cbs1p im Überstand der alkalischen Extraktion nachgewiesen (Körte *et al.*, 1989). Da integrale Membranproteine bei dieser Extraktion mit der Membran-Fraktion co-sedimentieren, spricht dieser Befund gegen eine integrale Membranverankerung. Cbs1p verfügt auch nicht über einen hydrophoben α -helicalen Bereich, der von ausreichender Länge wäre, eine Membran zu durchspannen. Daher sind genauere Analysen notwendig, um sowohl Art als auch verantwortliche Bereiche des Proteins für die Membranständigkeit zu bestimmen. Die matrixseitige Lokalisierung von Cbs1p an der inneren Mitochondrienmembran ergibt sich zwar aus der Funktion von Cbs1p, aber es existieren dazu noch keine experimentellen Belege.

Das bereits beschriebene Modell der membranvermittelten Translation impliziert außerdem eine Interaktion der Translationsaktivatoren sowohl mit der mRNA als auch mit Proteinen der generellen Translationsmaschinerie.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein Schwerpunkt der Arbeit beschäftigt sich mit den offenen Fragen zur Art der Membranassoziation von Cbs1p. Wie bereits beschrieben, verhält sich das Protein einerseits vergleichbar mit integralen Membranproteinen bei der Solubilisierung mit Detergenzien (Michaelis *et al.*, 1991), andererseits widersprechen dem die Analysen von *in vitro* importiertem Cbs1p mittels alkalischer Extraktion (Körte *et al.*, 1989). Untersuchungen von authentisch exprimiertem Cbs1p hinsichtlich des

Löslichkeitsverhalten unter Hochsalzbedingungen als auch mittels Carbonatextraktion sollen die Art der Membranassoziation im Detail charakterisieren.

Dabei soll auch der Einfluss hydrophober Proteinbereiche auf die Membranständigkeit bestimmt werden. Weiterhin sollen Experimente zur Proteinase K-Zugänglichkeit des Proteins Aufschluss über die topologische Ausrichtung geben.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung von Interaktionspartnern für Cbs1p und Cbs2p unter Verwendung des Two Hybrid-Systems (Fields and Song, 1989). Dazu soll eine Two Hybrid-cDNA-Bank von *S. cerevisiae* hergestellt und parallel zu einer *Schizosaccharomyces (S.) pombe* Two Hybrid-cDNA-Bank zum Screening eingesetzt werden. Letztere wird verwendet, um nach interagierenden homologen Proteinen in einem phylogenetisch entfernten Organismus zu suchen. Darüber hinaus soll die Interaktion von Cbs1p und Cbs2p mit ausgewählten potentiellen Interaktionspartnern getestet werden, u.a. mit Proteinen der kleinen mitochondrialen ribosomalen Untereinheit. Für die Translationsaktivatoren der COX3-mRNA konnte beispielweise gezeigt werden, dass diese untereinander (Brown *et al.*, 1994) sowie mit Proteinen der generellen Translationsmaschinerie (Haffter *et al.*, 1990; Haffter *et al.*, 1991; McMullin *et al.*, 1990) wechselwirken.

Trotz der voranschreitenden Sequenzierprojekte verschiedener prokaryontischer als auch eukaryontischer nukleärer und mitochondrialer Genome wurden bislang noch keine Proteine mit signifikanter Homologie zu Cbs1p oder Cbs2p in anderen Organismen gefunden.

Vor dem Hintergrund fehlender homologer Proteinbereiche sollen funktionell wichtige Bereiche von Cbs1p mittels verschiedener Mutagenesetechniken identifiziert werden. Durch „random“-Mutagenese sollen für die Funktion des Proteins wichtige Aminosäuren detektiert werden. Clusterungen von Mutationen essentieller Aminosäuren können als Ausgangsbasis für die Suche nach Motiven und homologen Bereichen zu anderen Proteinen genutzt werden. Gezielte Manipulationen am C- und N-Terminus des Proteins sollen Einblick in die funktionelle Bedeutung dieser Bereiche geben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne von Gal4p
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure(n)
BD	DNA-Bindedomäne von Gal4p
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CPS	„counts per second“
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxylterminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HA	Epitop des Hämagglutinin
HRP	„horseradish-peroxidase“; Meerrettich-Peroxidase

kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mRNA	messenger RNA
mt	mitochondrial
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“; offener Leserahmen
P	Pellet
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI-Mix	Proteinaseinhibitor-Mix
PL	Phospholipase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rc	„respiration competent“; atmungskompetent
rd	„respiration deficient“; atmungsdefekt
<i>rho</i> ⁺	mitochondriales Genom vollständig vorhanden
<i>rho</i> ⁰	vollständiger Verlust des mitochondrialen Genoms
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	„soluble“; löslich
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFH	„short flanking homology“; Homologie in kurzen flankierenden Bereichen
son.	„sonication“; mit Ultraschall behandelt
srRNA	kleine ribosomale RNA
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
UE	Untereinheit

üN	über Nacht
v/v	Volumenanteil/Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil/Volumenanteil
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

2.1.2 Feinchemikalien

dNTP-Mix	Gibco-BRL
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Temed	Gibco-BRL
APS	ICN
Agar	ICN, Roth
YNB	Difco, Gibco-BRL
BSA	Sigma
ECL ^{plus} -Systems™	Amersham Pharmacia Biotech
Proteinmarker:	
Benchmark™ Protein-Ladder	Gibco-BRL
Precision Protein Standards™	Bio-Rad
Ethidiumbromid	Sigma
CDP-Star	Tropix
DNA-Standard	
λ -DNA <i>EcoRI/HindIII</i>	Gibco-BRL
Heringssperma-DNA	Gibco-BRL
Ficoll 400	Sigma
Percoll	Sigma
Coomassie® Brillantblau G250	Merck
GalScreen™	Tropix

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme	Gibco-BRL
Alkalische Phosphatase	Gibco-BRL
<i>Taq</i> -Polymerase	Gibco-BRL, InViTek
<i>Pwo</i> -Polymerase	Boehringer, Mannheim
Combi-Polymerase	InViTek
Klenow-Fragment	Gibco-BRL
T4-Ligase	Promega
RNAse A	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	ICN
Zymolyase 20T	ICN
Phospholipase A ₂ (bee)	Sigma
Phospholipase D (cabbage)	Sigma
Phospholipase C (<i>B. cereus</i>)	Sigma

2.1.4 Antikörper

Die Antikörper wurden -falls erforderlich- entsprechend den Herstellerangaben gelöst und in 1x TBS/T (s. 2.1.11), 5 % Magermilchpulver („Glücksklee“, Nestlé) in den folgenden Verdünnungen eingesetzt:

monoklonale Antikörper:

mouse-Anti-HA (Boehringer, Mannheim)	1:1000
mouse-Anti-COX1 (Molecular Probes)	1:400
mouse-Anti-COX2 (Molecular Probes)	1:250
mouse-Anti-COX3 (Molecular Probes)	1:1000
mouse-Anti-AU5 (Babco)	1:1000
mouse-Anti-Gal4AD (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
mouse-Anti-Gal4BD (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000
mouse-Anti-Pgk1p (Molecular Probes)	1:1000

polyklonale Antikörper:

rabbit-Anti-Sco1p (Buchwald <i>et al.</i> , 1991)	1:1000
rabbit-Anti-Cit1p (Krummeck, 1992)	1:1000
rabbit-Anti-Hsp70p (erhalten von R. Lill, Marburg)	1:1000
rabbit-Anti-Cyt1p (Zollner <i>et al.</i> , 1992)	1:1000

sekundäre Antikörper:

sheep-Anti-mouse IgG-HRP (Amersham Pharmacia Biotech)	1:5000
donkey-Anti-rabbit IgG-HRP (Amersham Pharmacia Biotech)	1:5000

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG-AG Biotech bezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind alle verwendeten PCR-Primer mit Angabe der Position *CBS1*-homologer Bereiche (**fett**) und der verwendeten Schnittstellen (*kursiv*) aufgelistet. Mutationen sind unterstrichen; N=A, C, G oder T.

Nr.	Sequenz (5'→3')	Position bez. A ⁺ 1TG CBS1	Schnitt- stelle
#1	CCGTCCATGGGGCCTCGATTGATTA	-320 -306	NcoI
#2	CCGTGGATCCTGATTTACGCAAATG	+685 +699	BamHI
#3	TCCCATTTCCTTCGCAAATTGGCAGG	+506 +531	
#4	GCCAATTTGCAGAAGGAAATGGGATTAAC	+508 +536	
#5	ACGTATCTAGAGGCCTCGATTGATTAC	-320 -307	XbaI
#6	CCATGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGGTATGNNATAG	+659 +702	BamHI
#7	GTTTTTAATTTCTTTCCAATCGTTCAAGTTCTGAAAATC	+550 +577	
#8	AACGATTGAAAAGAAATTA AAAACGATAACAAAAAATTC	+613 +639	
#9	GAGTCGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#10	GAGACTTCTAGACTATGATTTACGCAAATGAATGAATTTTTTGTATCG	+624 +642	XbaI
#11	CCGTGGATCCCCAATCGTTCAAGTTC	+558 +573	BamHI
#12	CCGTGGATCCAATGAATTTTTTGT	+628 +642	BamHI
#13	ACGATGGATCCTATATAGTTTTTATAATTG	+647 +664	BamHI
#14	ACGATGGATCCTAGTAATTAATTAGAGG	+670 +684	BamHI
#15	GGAATAGTACAATATTACCTTTAGGAGGTGCCACGTACTACCCCTCGTACGCTGCA- GGTCGAC	-100 -57	
#16	TATTGTAAATAAAACAAAGGGATAACGGACAAAAGGCATCGTTTATCGATGAATT CGAGCTCG	+711 +755	
#17	ATCGAGGATCCAATCGAAATGGGCTTCATG	+862 +880	BamHI
#18	GAGTCGGATCCCCTATGATTCACGCAAATGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#19	GAGTCGGATCCCCTATGATTCCTTCCAAATGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#20	GAGTCGGATCCCCTATGATTCCTTCCAATTCGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#21	GAGTCGGATCCCCTATGATTTTTTCAATTTGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#22	GAGTCGGATCCCCTATGAATGATGCAAATGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#23	GAGACTTCTAGACTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGGTTGTCATATAG	+659 +702	XbaI
#24	GAGTCGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGGTATAGTTTTTAT AATTG	+647 +702	BamHI
#25	GAGTCGGATCCCCTACTGTTGCTGCTGTTGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#26	GAGTCGGATCCCCTATGATTGCTGCAATTGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#27	GAGTCGGATCCCCTATGATTGCTGCTGTTGGTAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#28	GAGTCGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGAAATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#29	GAGTCGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGTCATTAATTAGAGG	+670 +702	BamHI
#30	GAGTCGGATCCCCTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGACGTATGCATATAG	+659 +702	BamHI
#31	ACGATGGATCCGGCCTCGATTGATTAC	-320 -306	BamHI
#32	AGATCAGGTCGACTTGATTTACGCAAATGG	+684 +699	SalI
#33	AGATCAGGTCGACTATGATTTACGCAAATGG	+684 +699	SalI
#34	ACGATGGATCCATGAATCTCGACATGTTGAGGAC	+1 +23	BamHI
#35	ACGATGGATCCATGATAAACACGGTGACGAAAAAG	+88 +108	BamHI
#36	ACGATGGATCCATGTTGGTACGAGTACCAATGACTG	+229 +253	BamHI
#37	ACGATGGATCCATGACTGGAGACTTGAGCACAGG	+247 +269	BamHI
#38	ACGATGGATCCATGAACGAACTTTACAAAAATTGG	+289 +310	BamHI
#39	CGATCAAGAGAAGAGTCATCATGG		
#40	TAGTACGTGGCACCTCCTAAAGG		
#41	GATCGGATCCCGAATAAGGGTGATTCCAG		BamHI
#42	TGACTTCTAGATTACTCCTTATTCATGGTCTTTGC		XbaI
#43	GGCAGGATCCTCGTTACCATCTACAC		BamHI
#44	TGACTTCTAGACTACTTGGTGATATAAAGGGC		XbaI
#45	TGACATTTCTAGATTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGGTATGCACTCCT TATTCATGGTCTTTGCGTCTTGCC		XbaI
#46	TGACTTCTAGACTATGATTTACGCAAATGGTAATTAATTAGAGGTATGCACTTGGT GATATAAAGGGCAGAAAC		XbaI
#47	CCAGGCTGCAACTGCGGCTGCGGCTGCAACGGCTGCTGCTTTCCAATCGTTCAAGT TCTG	+576 +556	
#48	GCCGCAGCCGAGTTGCAGCCTGGGCAGCCGTTGCAGCCGAGAAATTA AAAACGA TAAC	+612 +630	

Für die Sequenzierung wurden folgende 5'-seitig mit IRD800 markierte Primer eingesetzt.

Primer	DNA-Sequenz (5'→3')	Bindestelle/Verwendung
S1	CTTTGCTTCTATTCTTCTATGG	CBS1-Allel [-57 bis -36]
S2rev	AAGGATAAGATCACTTTCC	CBS1-Allel [+590 bis +572]
S3	TTTGCAACTACTGTTGCTCG	CBS1-Allel [+31 bis +50]
S4	AGCTCGAGTAGTGAACATGG	CBS1-Allel [+423 bis +442]
S5rev	GTATTTCTGTGCTCAAGTC	CBS1-Allel [+275 bis +256]
UNI-21	TGTAAACGACGGCCAGT	Vektor-Insert in pRS415; YEp351
REV-29	CAGGAAACAGCTATGACC	Vektor-Insert in pRS415; YEp351
GAL4AD	TACCACTACAATGGATG	GAL4AD-Fusionen im Vektor pACT2 (for)
GAL4ADrev	AGTTGAAGTGAAGTTCGCGGG	GAL4AD-Fusionen im Vektor pACT2 (rev)
GAL4BD	TCATCGGAAGAGAGTAG	GAL4BD-Fusionen im Vektor pODB8/80 (for)
GAL4BDrev	ATCATAAGAAATTCGCCCGG	GAL4BD-Fusionen im Vektor pODB8/80 (rev)

2.1.6 Kit-Systeme

Jetquick PCR Purification Spin Kit	Genomed
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed
Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed
Jetstar 2.0 Plasmid Midi Kit	Genomed
Jetstar 2.0 Plasmid Maxi Kit	Genomed
RNeasy™	Qiagen
Oligotex™mRNA	Qiagen
Two Hybrid-cDNA-Library Construction Kit	ClonTech
Matchmaker Two Hybrid-System 2	ClonTech
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
DC-Protein Assay	Bio-Rad
Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.7 Zentrifugationen

Falls nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte in einer Tisch-Kühlzentrifuge 5417R (Eppendorf) im Standard-Rotor F 45-30-11 ausgeführt.

2.1.8 Stämme

2.1.8.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Gibco-BRL
BL21	F ⁻ [<i>dcm</i>], <i>ompT</i> , [<i>lon</i>], <i>hsdS</i> (<i>rB⁻ mB⁻</i>) <i>gal</i>	BioLabs
JM 109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>l-</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proA+B+</i> , <i>lacIqdM15</i>].	BioLabs

2.1.8.2 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle
DBY747	<i>MATa</i> , <i>his3-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> , [<i>rho</i> ⁺]	ATCC 44774
MK2	<i>MATα</i> , <i>cbs1-1</i> , <i>ade</i> , <i>his</i> , [<i>rho</i> ⁺]	(Pillar <i>et al.</i> , 1983)
GDV0	<i>MATa</i> , <i>his3-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> , <i>cbs1::URA3</i> , [<i>rho</i> ⁺]	(Rödel <i>et al.</i> , 1986)
UKB1	<i>MATa</i> , <i>his3-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> , <i>cbs1::Sphis5⁺</i> , [<i>rho</i> ⁺]	diese Arbeit
KL14-4a	<i>MATa</i> , <i>his1</i> , <i>trp2</i> , [<i>rho</i> ⁰]	(Wolf <i>et al.</i> , 1973)
IL993-5c	<i>MATα</i> , <i>ilv5</i> , [<i>rho</i> ⁰]	(Wolf <i>et al.</i> , 1973)
UM1	<i>MATα</i> , <i>ade5</i> , <i>his7-2</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> , <i>cbs2::URA3</i> , [<i>rho</i> ⁺]	(Michaelis, 1991)
Y187	<i>MATα</i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-200</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met⁻</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	ClonTech
HF7c	<i>MATa</i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-200</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3::GAL4_{17mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	ClonTech
CG-1945	<i>MATa</i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-200</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>cyh^r2</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3::GAL4_{17mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	ClonTech
Y190	<i>MATa</i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-200</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>cyh^r2</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	ClonTech
SFY526	<i>MATa</i> , <i>ade2-101</i> , <i>his3-200</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-901</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>URA3::GAL1-lacZ</i>	ClonTech

2.1.9 Vektoren & Plasmide

Name	Marker	Typ	Quelle
pRS415	<i>LEU2</i>	CEN-ARS	(Sikorski and Hieter, 1989)
YEp351	<i>LEU2</i>	2 μ	(Hill <i>et al.</i> , 1986)
YEp351-3HA	<i>LEU2</i>	2 μ	R. J. Schweyen, Wien
pRS415- <i>CBS1</i> Prom	<i>LEU2</i>	CEN-ARS	K. Tzschoppe, Dresden
p424ADH	<i>TRP1</i>	2 μ	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)
pACT2	<i>LEU2</i>	2 μ	ClonTech
pODB8	<i>TRP1</i>	2 μ	(Louvét <i>et al.</i> , 1997)
pODB80	<i>TRP1</i>	2 μ	(Louvét <i>et al.</i> , 1997)
pCL1	<i>LEU2</i>	2 μ	ClonTech
pVA3	<i>TRP1</i>	2 μ	ClonTech
pTD1	<i>LEU2</i>	2 μ	ClonTech
pGEX4T3	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i>	Amersham Pharmacia Biotech
pFA6a-His3MX6	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i>	P. Philippsen, Basel

2.1.10 Medien

2.1.10.1 Kultivierung von *E. coli*

<u>LB-Medium</u> für Platten	Trypton (ICN)	1,0 %
	Hefeextrakt (ICN)	0,5 %
	NaCl (Roth)	0,5 %
	Agar (ICN)	2,0 %
	pH-Wert auf 7,2 einstellen, autoklavieren	

LB^{Amp}-Medium Nach dem Abkühlen werden 100 mg/l Ampicillin hinzugegeben.
Die Inkubation der inokulierten Medien erfolgte bei 37°C.

<u>SOC-Medium</u>	Trypton	2,0 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	10,0 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,0 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10,0 mM
	Glucose	20,0 mM
	mit dH ₂ O auf 100 ml auffüllen (pH 7,0) und autoklavieren	

2.1.10.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*Vollmedien

YP	Hefeextrakt (ICN)	1 %
	Pepton (ICN)	2 %
für Platten	Agar (ICN)	2 %

variabler Zusatz der Kohlenstoffquelle:

YPD	Glucose	2 %
YPGal	Galaktose	2 %
YPGly	Glycerin	3 % (w/v)
YPEG	Glycerin	3 % (w/v), Ethanol 1 %
YPRaf	Raffinose	2 %

Lactatmedium

Lactat (90 %)	22,0 ml/l
Glucose	1,0 g/l
Hefeextrakt	3,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
CaCl ₂ x H ₂ O	0,5 g/l
MgCl ₂ x 2H ₂ O	0,6 g/l
NaCl	0,5 g/l
NaOH	8,0 g/l

Den pH-Wert mit NaOH auf 5,5 einstellen, mit dH₂O auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

Minimalmedium (MM)

YNB w/o Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Difco, Gibco-BRL)	1,7 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
oder	
YNB w/o Aminosäuren (Difco)	6,7 g
Glucose	20,0 g
Agar (ICN)	25,0 g

mit dH₂O auf 1 l auffüllen und pH-Wert einstellen (pH 5,6)

Supplemente

Dem Minimalmedium wurden nach dem Autoklavieren die entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleobasen in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Aminosäure/Nukleobase	100x Stammlösung
L-Leucin	10 g/l
L-Tryptophan	2 g/l
L-Histidin	2 g/l
L-Methionin	2 g/l
L-Lysin	3 g/l
Adenin-Hemisulfat	2 g/l
Uracil	2 g/l

2.1.11 Puffer und Stammlösungen

Ampicillin-Stammlösung	1000x: 100 mg/ml Ampicillin (Roth) in ddH ₂ O
APS (10 % w/v))	1 g Ammoniumperoxodisulfat/10 ml Wasser (-20°C)
Carrier-DNA	2 mg/ml Heringssperma-DNA, 5 min bei 100°C denaturieren
Cracking-Buffer	8 M Urea; 5 % (w/v) SDS; 40 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1 mM EDTA; 0,4 mg/ml Bromphenolblau für 1 ml frisch zusetzen: 10 µl β-Mercaptoethanol, 1 µl Proteinaseinhibitor-Mix, 5 µl 1 M PMSF
Ethidiumbromid	10 mg/ml Stammlösung in ddH ₂ O
Natriumacetat	3 M, pH 5,2 mit Essigsäure einstellen
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
PEG	50 % (w/v) PEG 3350 (Sigma)
PMSF	1 M PMSF in DMSO
Proteinaseinhibitor-Mix (PI-Mix)	1000x Stammlösung: 2 mg/ml der folgenden Proteinaseinhibitoren in DMSO gelöst: Aprotinin, Leupeptin, Chymostatin, Benzamidin, Pepstatin (Sigma)
RNAse A	10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 15 mM NaCl 15 min bei 100°C; bei -20°C lagern
TBE	10x Stammlösung: 108 g Tris/HCl; 55 g Borat; 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
TBS	20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 137 mM NaCl
TBS/T	20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0
X-Gal	20 mg/ml in DMF; dunkel bei -20°C lagern
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 16,10 g/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 5,50 g/l KCl 0,75 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,25 g/l pH-Wert 7,0; autoklavieren

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 PET-Test

Zellen des zu untersuchenden Stammes wurden auf einer YPD-Platte direkt mit dem *rho*⁰-Testerstamm des entgegengesetzten Paarungstyps (s. 2.1.8.2: IL993-5c bzw. KL14-4a) gemischt. Alternativ wurden eine Zellsuspension des entsprechenden Testerstammes bereits auf einer YPD-Platte gleichmäßig flächendeckend ausgespaltelt und die zu testenden Kolonien bzw. Kolonieausstriche durch Replika-Stempeln aufgebracht. Nach Inkubation üN bei 30°C wurden die erfolgte Paarung mikroskopisch kontrolliert (Zygoten) und die Kreuzungsansätze auf Platten mit YPEG überstempelt.

2.2.1.2 Kreuzungen von Hefestämmen für Two Hybrid-Analysen

Fusionskonstrukte mit der Gal4pBD im Vektor pODB8 bzw. pODB80 wurden in den Stamm Y187 (*MAT α*) transformiert und die Transformanden in jeweils 5 ml Selektionsmedium (-Trp) üN propagiert. In den Hefestamm HF7c (*MATa*) wurden die pACT2-Derivate mit den Gal4pAD-Fusionen transformiert und die Transformanden in jeweils 5 ml Selektivmedium (-Leu) üN angezogen.

In sterilen Mikrotiterplatten wurde mit einer 8-Kanalpipette 100 µl YPD-Medium vorgelegt und jeweils 50 µl der Y187- bzw. HF7c-Kulturen hinzupipettiert. Nach Inkubation üN bei 30°C wurden mit einer 8-Kanalpipette je 10 µl der Kreuzungsansätze aufgenommen und auf eine Selektivmediumplatte (Ø 150 mm) ohne die As Tryptophan, Leucin und Histidin (vgl. 2.2.2.14.4) zum Test auf Aktivierung des Reportergens *HIS3* getropft. Parallel wurden je 10 µl der Kreuzungsansätze auf einer Selektivmediumplatte (-Trp, -Leu) ausgebracht, um den positiven Verlauf der Kreuzung zu bestätigen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Gelelektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von DNA-Molekülen

DNA-Moleküle im Längenbereich bis 10 kbp wurden im Agarosegel (0,8 bis 2 %ig in 1x TBE-Puffer, Laufpuffer: 1x TBE) im konstanten elektrischen Feld (ca. 9 V pro cm Elektrodenabstand) aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde der Gellösung vor dem Erstarren Ethidiumbromid zugesetzt (1 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung auf 100 ml Gellösung).

Als Größenstandard wurde *EcoRI/HindIII* geschnittene λ -DNA eingesetzt.

2.2.2.2 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.2.2.1 Nukleinsäurefällung mit Ethanol

Zur Konzentrierung und Reinigung wurden der gelösten DNA 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und das 2,5-fache Volumen an 98 %igem Ethanol hinzugefügt.

Die Fällung der DNA erfolgte für 60 min bei -20°C (oder 30 min bei -80°C). Die DNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 U/min und 4°C sedimentiert. Das Waschen des Pellets erfolgte mit 500 µl 70 %igem Ethanol. Nach Trocknung der DNA bei RT für ca. 2-5 min in der „Speed Vac“ wurde das Pellet in sterilem ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Proben wurden 1:1 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Roth) gemischt und bei 13000 U/min 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde 2x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) „gewaschen“, um Phenolrückstände zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA (2.2.2.2.1).

2.2.2.2.3 Aufreinigung und Konzentrierung der DNA über Affinitätssäulen

Für die Aufreinigung von DNA wurden Kits der Firma Genomed verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Elution der DNA von der Säulenmatrix wurde steriles H₂O (HPLC-Grad, auf 65°C temperiert) verwendet. Nach 1 min Inkubationszeit wurde die DNA durch Zentrifugation eluiert.

2.2.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

2.2.2.3.1 PCR-Reaktion

Für die Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes wurden Oligonucleotidprimer (MWG-AG Biotech) mit 5'-seitig eingefügten Restriktionsenzym-Schnittstellen entsprechend der geplanten Klonierungsstrategie eingesetzt. Da die Primer somit einen nichthomologen Bereich (ca. 1/3 des Primers) besitzen, der frühestens beim 3. Zyklus der PCR-Reaktion eine komplementäre Bindung eingehen kann, erwies sich eine 2-Stufen PCR als günstig. Dabei wurde die Annealingtemperatur der ersten 5 Zyklen entsprechend der Schmelztemperatur des homologen Primerbereiches ($T_s(1)$, abzüglich 5°C) gewählt. Die folgenden Zyklen wurden danach bei einer Annealingtemperatur durchgeführt, die der Schmelztemperatur des gesamten Primers entsprach ($T_s(2)$, abzüglich 5°C).

Für die Berechnung der Schmelztemperaturen (T_s) lieferte die folgende empirische Formel (MWG-AG Biotech) hinreichend zuverlässige Werte:

$$T_s = 69,3^{\circ}\text{C} + (0,42 \times [\text{GC-Gehalt \%}]) - (650/\text{Primerlänge})$$

Das folgende PCR-Programm wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA des Hefestammes DBY747 bzw. mit Plasmid-DNA als Template eingesetzt:

5 min	94°C	Initialdenaturierung	
Zugabe von Polymerase („hot start“)			
1 min	94°C	Denaturierung	} 5 Zyklen
1 min	T _s (1)-5°C	Annealing	
2 min	72°C	Extension	
1 min	94°C	Denaturierung	} 25 Zyklen
1 min	T _s (2)-5°C	Annealing	
2 min	72°C	Extension	
5 min	72°C	Extension	

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für spätere Klonierungen wurde *Pwo*-Polymerase (Boehringer, Mannheim) oder Combi-Polymerase (InViTek), welche beide „proof-reading“-Aktivität besitzen, verwendet.

2.2.2.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Der 100 µl PCR-Reaktionsansatz wurde über Säulen aufgereinigt (Genomed) und das DNA-Fragment mit 40 µl H₂O (HPLC-Grad, 65°C) eluiert.

2.2.2.3.3 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsspaltung der PCR-Fragmente und des Vektors wurde -falls erforderlich- mit zwei Enzymen simultan durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 37°C (30°C bei *Sma*I) für 2-6 h inkubiert:

38 µl Eluat (s. 2.2.2.3.2)
 5 µl Puffer (10x)
 1 µl Restriktionsenzym 1
 1 µl Restriktionsenzym 2
 5 µl dd H₂O

Die geschnittenen PCR-Fragmente bzw. der Vektor wurden zur Aufreinigung auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die DNA der entsprechenden Gelbande mittels Gelelutionskit (Genomed) isoliert.

2.2.2.3.4 Erzeugung von „blunt-ends“

5′-seitig überhängende DNA-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Gibco-BRL) aufgefüllt:

0,5-1 µg	DNA	
1 µl	2 mM dNTPs	
3 µl	10x Puffer	
1 µl	Klenow-Fragment	
ad 30 µl	ddH ₂ O	10-15 min bei RT inkubieren

Für den Verdau von 3′-seitig überhängenden DNA Einzelsträngen wurde die 3′→5′-Exonukleaseaktivität der Klenow-Polymerase in Abwesenheit von dNTPs genutzt.

2.2.2.3.5 Dephosphorylierung

Die Dephosphorylierung wurde mit Thermosensitiver Alkalischer Phosphatase (TsAP, Gibco-BRL) durchgeführt:

x µl	DNA
4 µl	10x Puffer
1 µl	Phosphatase
ad 40 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte nach Zugabe von 4 µl 200 mM EDTA, pH 8,0 bei 65°C für 15 min.

2.2.2.3.6 Ligation

Nach Abschätzen eines molaren Fragment : Vektor-Verhältnisses von ca. 3:1 im Agarosegel wurden die entsprechenden Volumina an Fragment bzw. Vektor in einem 20 µl Ligationsansatz eingesetzt. Es wurde die T4-Ligase (1 µl [ca. 3 U] für „sticky-end“- bzw. 2 µl für „blunt-end“-Ligationen) verwendet. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei Raumtemperatur für wenigstens 2 h bei „sticky-end“-Ligationen bzw. über Nacht bei 16°C für „blunt-end“- oder „sticky-end“-Ligationen.

2.2.2.4 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Diese Methode wurde generell für die Transformation von Plasmid-DNA aus Plasmid-„rescue“-Präparationen und Ligationsansätzen angewandt.

2.2.2.4.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

3 ml LB-Medium wurden mit dem *E. coli*-Stamm DH5 α angeimpft und üN bei 37°C inkubiert. 400 ml LB-Medium (Hauptkultur) wurden mit 4 ml der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert (ca. 3 h). Das Kulturgefäß wurde danach für wenigstens 15 min auf Eis gestellt. Das weitere Vorgehen erfolgte bei 4°C. Die Zellen wurden in zwei 400 ml Zentrifugenbechern geerntet (6000 U/min, 10 min, 4°C, Avanti J25, Beckman, Rotor JLA 10500) und mit je 200 ml kaltem sterilen ddH₂O gewaschen. Der Waschschrift wurde mit 100 ml wiederholt. Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem 10 %igen Glycerol resuspendiert, erneut zentrifugiert (6000 U/min, 4°C, 10 min, s.o.) und in 2 ml kaltem 10 %igen Glycerol aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 40 μ l Aliquots portioniert (auf Eis). Die Aliquots kompetenter Zellen können mehrere Wochen bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.4.2 Dialyse der DNA-Lösung

Für die Elektroporation wurden maximal 4 μ l DNA-Lösung eingesetzt. Bei salzreichen Proben (Ligationen, Plasmid-„rescue“) wurde die DNA gegen steriles ddH₂O dialysiert. Dazu wurde eine Membran (Millipore VS Membran, Porendurchmesser 0,025 μ m) auf die Wasseroberfläche einer mit sterilem ddH₂O gefüllten Petrischale platziert und 4 μ l der zu transformierenden DNA-Lösung vorsichtig darauf pipettiert. Nach ca. 15 min wurden 4 μ l der dialysierten DNA-Lösung abpipettiert und mit einem 40 μ l Aliquot der kompetenten Zellen vermischt.

2.2.2.4.3 Elektroporation

Für die Elektroporation von *E. coli* wurden Küvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Bio-Rad) verwendet. Am Gene-Pulser II (Bio-Rad) wurden folgende Parameter eingestellt: Spannung: 2,5 kV, Kapazität: 25 μ F, Widerstand: 200 Ω .

Die Dauer der Entladung („time constant“) sollte zwischen 4,5 und 5 ms liegen. Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml auf 37°C temperiertes SOC-Medium dazugegeben und die Suspension 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (3000 U/min, 3 min) und auf LB^{Amp}-Platten ausgebracht.

2.2.2.5 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen

2.2.2.5.1 Plasmid-Minipräparation (Birnboim and Doly, 1979)

1,5 ml üN-Kultur wurde in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose) resuspendiert, 150 µl NaOH/SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS; frisch ansetzen) hinzugefügt, leicht geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,2 wurde durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes der Ansatz gemischt und 5 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde bei 14000 U/min, 4°C, ≥20 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl Isopropanol gemischt. Die Fällung und Sedimentierung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zentrifugation (14000 U/min, RT, ≥30 min).

Das Pellet wurde mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14000 U/min, 10 min) wurde der Überstand verworfen. Das abschließend im Vakuum getrocknete Pellet (ca. 2 min) wurde in 40 µl ddH₂O gelöst.

Bei Verwendung des *E. coli*-Stammes DH5α traten keine Probleme mit DNase-Kontaminationen in den Plasmid-Präparationen auf. Plasmid-Isolationen aus Klonen des *E. coli*-Stammes JM109 mussten wegen starker DNase-Aktivitäten zusätzlich mit Phenol/Chloroform extrahiert werden (2.2.2.2.2).

2.2.2.5.2 Kontrollverdau zur Identifizierung positiver Klone

Für jede Minipräparation wurde ein Kontrollverdau wie folgt angesetzt:

3 µl DNA-Lösung der Minipräparation
1 µl RNase A (10 mg/ml)
je 0,2-0,3 µl Restriktionsenzym(e) (10 U/µl)
auf 10 µl mit ddH₂O auffüllen
Inkubation für ≥1,5 h bei entsprechender Temperatur

2.2.2.5.3 Plasmid-Minipräparation „Sequencing grade“

Hochreine Plasmid-DNA, die u.a. für die Sequenzierung geeignet ist, wurde unter Verwendung des „Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit“ nach den Angaben des Herstellers präpariert.

2.2.2.6 Transformation von Hefezellen (Schiestl and Gietz, 1989)

Die folgende Methode ermöglicht eine hocheffiziente Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen und kann daher auch bei DNA-Bank-Transformationen eingesetzt werden (ca. 10^4 bis 10^5 Klone/µg DNA). Genügt eine niedrigere Effizienz, so kann bei der Herstellung der kompetenten Zellen variiert werden. Es können Zellen einer üN-Kultur oder aber Zellen von einer Platte (YPD), die nicht älter als 1 Woche sein sollten, verwendet werden.

2.2.2.6.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

In einem 50 ml Kolben wurden 10 ml YPD angeimpft und üN bei 30°C geschüttelt. Je nach Stamm wurden 1-2 ml dieser Vorkultur für die Inokulation einer 50 ml Hauptkultur (YPD) verwendet. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Zellen geerntet (3000xg, 5 min, 4°C) und mit ca. 1 ml H₂O in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden sedimentiert (15 s, max. Geschwindigkeit, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 500 µl 10 %igem Glycerol resuspendiert und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese Aliquots der kompetenten Hefezellen können bei -80°C (ohne Schockgefrieren) mehrere Monate gelagert oder sofort weiter verwendet werden.

2.2.2.6.2 Transformation

Die Zellen eines Aliquots wurden pelletiert (15 s, max. Geschwindigkeit, 4°C) und der Überstand entfernt. Zum Pellet wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

- (1) 240 µl PEG 3350; 50 % (w/v)
- (2) 36 µl 1 M LiAc
- (3) 25 µl ss Carrier-DNA (2 mg/ml Heringssperma-DNA, bei 100°C 5 min denaturiert)
- (4) 50 µl Plasmid-DNA (0,5-1 µg)

Durch kräftiges „Vortexen“ (1 min) wurde das Pellet resuspendiert und danach 30 min bei 30°C und anschließend 20 min bei 42°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 s, max. Geschwindigkeit, 4°C) und der Überstand abpipettiert. Je nach erwarteter Effizienz und eingesetzter DNA-Menge wurde das gesamte Pellet in 200 µl bzw. 1 ml sterilem H₂O aufgenommen und die Zellen auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.2.7 Präparation genomischer DNA aus Hefen (Kaiser *et al.*, 1994)

Hefezellen wurden in 5 ml YPD üN angezogen und in einem 2 ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert (3000 U/min, 5 min). Das Pellet wurde in 500 µl 1 M Sorbitol; 0,1 M EDTA; pH 7,5 resuspendiert. Die Sphäroplastierung erfolgte durch Zusatz von 20 µl Zymolyase 20T Lösung (25 mg/ml) sowie 2 µl β-Mercaptoethanol. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 20 mM EDTA; aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl 10 %iger SDS-Lösung wurde der Ansatz durch „Vortexen“ gemischt, 30 min bei 65°C inkubiert, danach mit 200 µl 5 M Kaliumacetat vorsichtig gemischt und 1 h auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde bei 13000 U/min 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 1 Volumenteil Isopropanol für 5 min bei RT. Nach Zentrifugation für 10 s bei 13000 U/min wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 1 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für

30 min bei 37°C inkubiert. Die genomische DNA wurde abschließend unter Zusatz von 30 µl 3 M Natriumacetat und 200 µl Isopropanol gefällt und bei 13000 U/min für 20 s pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.2.8 Plasmid-„rescue“

10 ml Kultur (Minimalmedium) wurden inokuliert und für ca. 36 h bei 30°C inkubiert. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde die gesamte Kultur in mehreren Zentrifugationsschritten bei 12000 U/min für 30 s abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS; 2 % Triton X-100) resuspendiert. In ein separates Eppendorfgefäß wurden zuerst 0,3 g Glasperlen (Ø 0,45 mm) und 200 µl Phenol/Chloroform gegeben, danach wurde die Hefesuspension dazupipettiert. Die Zellen wurden durch 2-fache Wiederholung der folgenden Schritte aufgeschlossen:

1 min „Vortexen“ + Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei RT

Nach Zentrifugation (12000 U/min; 5 min) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit Ethanol gefällt (s. 2.2.2.2.1). Das getrocknete Pellet (2 min in der Vakuumtrocknung-„Speed Vac“) wurde in 20 µl H₂O gelöst. 4 µl davon wurden dialysiert (s. 2.2.2.4.2) und durch Elektroporation in *E. coli* transformiert (s. 2.2.2.4).

2.2.2.9 SFH-PCR

Die SFH (short flanking homology)-PCR (Wach *et al.*, 1997) wurde eingesetzt, um eine *Sphis5⁺* Replacementkassette (Wach *et al.*, 1997) zu amplifizieren (Template: Plasmid pFA6a-HIS3MX6, erhalten von P.Philippsen, Basel). Die Kassette enthält alle Informationen zur Expression des *Sphis5⁺*-Genes (*TEF*-Promotor [aus *Ashbya (A.) gossypii*], *Sphis5⁺*-ORF [aus *S. pombe*], *TEF*-Terminator [aus *A. gossypii*]), dessen Genprodukt das SchIS3p funktionell ersetzen kann. Die entsprechenden Primer sind 3'-seitig (20 bp) komplementär zu flankierenden Sequenzen der

Replacementkassette und besitzen einen 40 bp langen 5'-seitigen „Überhang“, der komplementär zur Insertionsstelle im Genom ist. Für die Amplifikation einer *CBS1*-spezifischen Replacementkassette wurden die Primer #15 und #16 verwendet:

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 min	95°C	Initialdenaturierung	
Zugabe von Polymerase („hot start“)			
30 s	95°C	Denaturierung	} 18 Zyklen
30 s	55°C	Annealing	
1 min 30 s	72°C	Extension	
4 min	72°C	Extension	

2.2.2.10 „Overlap-Extension“-PCR

Mit der „overlap-extension“-PCR (Pogulis *et al.*, 1996) können an beliebigen Stellen eines Genes gezielt Mutationen (Punktmutationen, Deletionen und Insertionen) eingeführt werden. Deletionen oder Insertionen, die sonst über Schnittstellen von Restriktionsenzymen eingebracht wurden, können mit dieser Methode ohne zusätzliche klonierungsbedingte Codons konstruiert werden. Prinzipiell erfolgt zunächst eine getrennte PCR-Amplifikation zweier Teilbereiche, der sogenannten „Megaprimer“. Dabei wird in jedem Ansatz jeweils ein „gewöhnlicher“ und ein „overlap“ (ol)-Primer kombiniert, der 3'-seitig etwa 15 bp komplementär zum Template ist und sich 5'-seitig mit dem anderen ol-Primer überlappt. Dieser Überlappungsbereich gewährleistet die komplementäre Basenpaarung der „Megaprimer“ im zweiten Amplifikationsschritt. Unter Beachtung dieser beiden Bedingungen können die entsprechenden Mutationen durch geeignetes Primerdesign eingeführt werden.

Die Produkte der ersten PCR wurden durch Gelelektion von Primern und Template getrennt. Für die zweite „finale“ PCR mit den beiden „außen“ liegenden Primern wurden die gereinigten PCR-Produkte in äquimolarem Verhältnis zum Reaktionsansatz gegeben. Für die Auswahl der Reaktionsbedingungen gelten die gleichen Überlegungen wie unter 2.2.2.3.1 beschrieben.

2.2.2.11 DNA-Hybridisierung (Southern, 1975)

2.2.2.11.1 Sondenmarkierung

Die Herstellung der *CBS1*-spezifischen Sonde erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ von Boehringer, Mannheim. Die Markierung beruht auf der Inkorporation von Digoxigenin-gekoppeltem dUTP während der PCR-Reaktion.

PCR-Reaktion:

2,0 µl	genomische DNA des Stammes DBY747
1,0 µl	Primer #39 (100 pmol/µl)
1,0 µl	Primer #40 (100 pmol/µl)
5,0 µl	10x PCR Puffer + MgCl ₂
2,0 µl	10x PCR DIG Mix (enthält DIG-dUTP)
3,0 µl	10x dNTP Mix
0,75 µl	Polymerase (<i>Taq</i>)
35,25 µl	ddH ₂ O

PCR-Bedingungen:

5 min	95°C	Initialdenaturierung	
30 s	95°C	Denaturierung	} 10 Zyklen
30 s	50°C	Annealing	
2 min	72°C	Extension	
30 s	95°C	Denaturierung	} 20 Zyklen
20 s-1 min	58°C	Annealing	
2 min + 20 s			
Verlängerung pro Zyklus	72°C	Extension	
7 min	72°C	Extension	

Ein 5 µl-Aliquot des PCR-Ansatzes wurde zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen und die Fragmentgröße bestimmt (durch das eingebaute DIG-dUTP wird das Molekulargewicht gegenüber der unmarkierten DNA erhöht).

Zur Entfernung markierter Nukleotide wurde der PCR-Ansatz gereinigt (s. 2.2.2.3.2) und die Sondenkonzentration auf einem 1 %igen Agarosegel im Vergleich zum parallel aufgetragenen DNA-Größenstandard (λ -DNA *EcoRI/HindIII*) abgeschätzt.

Die Markierungseffizienz wurde mittels Dot-Blot im Vergleich zur markierten Kontroll-Sonde des Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.11.2 Hybridisierung

1 µg der genomischen DNA wurde mit *EcoRI* geschnitten (37°C, üN) und in einem 1 %igen Agarosegel bei 40 V für 12 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung wurde nach Ethidiumbromidfärbung kontrolliert und für die spätere Größenbestimmung der Fragmente mit einem Lineal fotografisch dokumentiert. Danach wurde das Gel nacheinander in

Depurinierungslösung (0,25 N HCl; 20 min, RT),

Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,0 M NaCl; 2x 20 min, RT) und

Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl, pH 7,5; 3,0 M NaCl; 30 min, RT)

unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) mittels Kapillarblot unter Verwendung von 20x SSC transferiert. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und die DNA durch UV-Licht (3 min, 320 nm) an die Nylonmembran fixiert.

Nach dem Waschen der Membran in 2x SSC für 5 min erfolgte die Prähybridisierung für 2 Stunden bei 65°C mit 25 ml Hybridisierungspuffer. Anschließend wurde die Hybridisierung bei 65°C mit Hybridisierungslösung (5-20 ng Sonde/ml Hybridisierungspuffer) durchgeführt. Danach wurde die Membran in vortemperierten Waschlösungen geschwenkt:

Waschpuffer I, (2x SSC; 0,1 % SDS; 1 min, 65°C)

Waschpuffer I, (30 min, 65°C)

Waschpuffer II, (0,5x SSC; 0,1 % SDS; 30 min, 65°C)

2.2.2.11.3 Detektion DIG-markierter DNA

Die Membran wurde 30 min in Blockierungslösung geschwenkt und danach mit Antikörperlösung (0,3 ml/cm² Membran, „anti-DIG-AP-conjugate“ Stammlösung - 1:20000 in Blockierungslösung verdünnt) für 30 min inkubiert. Die Membran wurde 2x für 15 min (RT) in Waschpuffer III (1x Maleinsäure; 0,3 % (v/v) Tween 20) gewaschen und in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran für

5 min in der Substratlösung (CDP-Star 1:100 in Detektionspuffer) geschwenkt und blasenfrei in einen Folienbeutel überführt. Die überschüssige Substratlösung wurde entfernt (Filterpapier).

Die Detektion erfolgte durch einen Chemilumineszenz-Film (Amersham Pharmacia Biotech).

20x SSC:	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat-dihydrat autoklavieren
Standard-Hybridisierungspuffer:	5x SSC 0,1 % N-Laurylsarcosin 0,1 % SDS 1,0 % Blockierungslösung mit sterilem ddH ₂ O auffüllen
10x Maleinsäurepuffer:	1,0 M Maleinsäure 1,5 M NaCl mit NaOH pH 7,5 einstellen
10x Blockierungslösung:	10 % (w/v) Blockierungsreagenz 0,10 M Maleinsäure 0,15 M NaCl
Detektionspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl

2.2.2.11.4 Entfernung der hybridisierten Sonde („Stripping“)

Die Membran wurde für 1 min in Wasser gewaschen und danach 2x für 10 min in alkalischer „probe-stripping solution“ (37°C) inkubiert. Durch diesen Schritt wird die alkali-labile, DIG-markierte Sonde entfernt. Die Membran wurde abschließend in 2x SSC (15 min) gespült und für die nächste Prähybridisierung eingesetzt.

„probe-stripping solution“	0,2 N NaOH 0,1 % SDS
----------------------------	-------------------------

2.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des „Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech) und 5´-seitig IRD800 markierter Primer (MWG-AG Biotech) mit dem LICOR4000 Sequencer (MWG-AG Biotech) nach folgendem Protokoll:

2.2.2.12.1 Gelelektrophorese

Herstellung des Sequenziergels:

30,0 ml Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (Sequagel-XR, Biozym)
 7,5 ml Puffer (Sequagel-complete, Biozym)
 0,4 ml DMSO (Sigma)

Die Gellösung wurde filtriert (Faltenfilter) und kurz im Vakuum entgast.

Nach ca. 2 h Polymerisationszeit wurde der Gelvorlauf bei 1500 V, 45 mA, 50 W, 50°C gestartet und für 30 min durchgeführt. Nach Erreichen der Temperatur (50°C) wurde die Lasereinheit justiert (Auto-Gain/Focus/Auto-Gain; entsprechend der Anleitung). Die Proben wurden nach Erreichen einer Spannung von ca. 1400 V aufgetragen.

2.2.2.12.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion wurde in 96-Feld-Mikrotiterplatten im Thermocycler (MWG-AG Biotech) durchgeführt. Herstellung des DNA/Primer-Gemisches:

DNA (ca. 100 bis 130 ng pro 1000 bp Template bei Plasmid-DNA):	x µl
Primer (1 pmol/µl)	2 µl
ddH ₂ O	<u>y</u> µl
	21 µl

In eine Mikrotiterplatte wurden je 1 μl A/C/G/T Reagenz pro Probe vorgelegt. Dazu wurden je 5 μl des DNA/Primer-Gemisches pipettiert und jeder Ansatz mit ca. 15 μl Mineralöl überschichtet. Für die PCR wurden folgende Bedingungen eingesetzt:

4 min	95°C	Initialdenaturierung	
30 s	95°C	Denaturierung	} 25 Zyklen
30 s	T_a	Annealing	
30 s	70°C	Extension	

Die Annealingtemperatur (T_a) wurde ca. 3°C über der errechneten Schmelztemperatur (T_s) der Primer (Formel s. 2.2.2.3.1) gewählt. Nach erfolgter Reaktion wurden jeweils 3 μl Stopplösung zugegeben.

10x TBE für Sequenzierung:	Borat	55,0 g
	0,5 M EDTA	40 ml
	Tris	108,0 g
	mit ddH ₂ O auf 1 Liter auffüllen	

1,5 μl pro Sequenzierreaktion wurden auf das Gel aufgetragen.

2.2.2.13 Tieftemperatur-Spektren der Cytochrome

50 ml Hauptkultur (YPGal, YPRaf oder YPD) wurden mit 1 ml Vorkultur angeimpft und üN bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Alternativ können die Hefen auch direkt von einer frischen Vollmediumplatte verwendet werden. Die Zellen wurden nach der Ernte einmal in dH₂O gewaschen, bei 3500 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die „Zellpaste“ (Zellen im restlichen Wasser resuspendiert) wurde mit einer Spatelspitze Natriumdithionit zur Reduktion der Cytochrome versetzt und anschließend mit einem Spatel gleichmäßig in eine Tieftemperaturküvette überführt. Die Küvette wurde in flüssigen Stickstoff getaucht und erst unmittelbar vor der Messung entnommen. Die Absorptionsmessung erfolgte photometrisch (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) in einem Wellenlängenbereich zwischen 500 und 650 nm. Der Abgleich des Photometers erfolgte mit Parafilm, dessen Schichtdicke so gewählt wurde, dass die Absorption bei der Messung der Proben zwischen 0 und 1 liegt.

2.2.2.14 Two Hybrid-System

2.2.2.14.1 Herstellung einer Two Hybrid-cDNA-Bank

Für die Herstellung der Two Hybrid-cDNA-Bank wurde der „Two Hybrid-cDNA-Library Construction Kit“ (ClonTech) verwendet. Der $\Delta gal4$ Hefestamm Y190 wurde in 400 ml YPEG propagiert und nach der Ernte der Zellen die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy™-Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Die Zellen wurden dazu mittels Glasperlen unter kräftigem „Vortexen“ (5x 1 min) aufgeschlossen. Zwischenzeitlich wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei RT aufgetaut. Ein Aliquot der RNA-Präparation wurde zur Kontrolle auf ein 1 %iges Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen. Für die Aufreinigung der polyA⁺-mRNA wurde der Oligotex™mRNA-Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die isolierte polyA⁺-mRNA wurde zur Synthese der cDNA unter Verwendung des „Two Hybrid-cDNA-Library Construction Kit“ (ClonTech) entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Je 6 µg polyA⁺-mRNA wurden zur Erststrangsynthese mittels Oligo(dT)₂₅(dN)- bzw. random (dN)₆-Primern eingesetzt. Alle Synthese- und Inkubationsschritte wurden im Thermocycler (Gene-Amp PCR-System 2400, Perkin Elmer) durchgeführt. Die cDNA-Fragmente wurden über *EcoRI*-Adaptoren in den im Kit enthaltenen *EcoRI*-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pGAD10 kloniert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation des *E. coli*-Stammes DH5α mittels Elektroporation eingesetzt. Die ampicillinresistenten Klone wurden gepoolt und die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.2.2.5.3).

2.2.2.14.2 Klonierungen für das Two Hybrid-System

Für die Versuche mit dem Two Hybrid-System wurde das auf Gal4p basierende Matchmaker Two Hybrid-System 2 (ClonTech) verwendet. Der darin enthaltene Vektor pAS2-1 zur Klonierung der Fusionen mit der Gal4p-Bindedomäne wurde wegen der toxischen Wirkung des *CYH2^R*-Genprodukts (Louvet *et al.*, 1997) durch die Vektoren pODB8 (mit HA-Epitop) bzw. pODB80 ersetzt.

Nr.	Protein	Fusionierte As	PCR-Primer-Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
1.	Cbs1p	30-233	CCGTCCATGGGCATAAAACACGGTG CCGTGGATCCTGATTTACGCAAATG	NcoI BamHI
2.	Cbs1p	30-215	CCGTCCATGGGCATAAAACACGGTG CCGTGGATCCAATGAATTTTTGTGTT	NcoI BamHI
3.	Cbs1p	30-191	CCGTCCATGGGCATAAAACACGGTG CCGTGGATCCCCAATCGTTCAAGTTC	NcoI BamHI
4.	Cbs1p	30-146	CCGTCCATGGGCATAAAACACGGTG GATATGGATCCTTCACTACTCGAGCTCG	NcoI BamHI
5.	Cbs1p	147-233	GATATCCATGGACTCGATAAGCTGG CCGTGGATCCTGATTTACGCAAATG	NcoI BamHI
6.	Cbs1p	147-215	GATATCCATGGACTCGATAAGCTGG CCGTGGATCCAATGAATTTTTGTGTT	NcoI BamHI
7.	Cbs1p	147-191	GATATCCATGGACTCGATAAGCTGG CCGTGGATCCCCAATCGTTCAAGTTC	NcoI BamHI
8.	Cbs1p	176-233	GATATCCATGGGATTAACCTCCAGC CCGTGGATCCTGATTTACGCAAATG	NcoI BamHI
9.	Cbs1p	176-215	GATATCCATGGGATTAACCTCCAGC CCGTGGATCCAATGAATTTTTGTGTT	NcoI BamHI
10.	Cbs2p	1-389	GGCCCATGGGAATGTCAAGCTCAATA CCTTGGATCCTCACAGGTAATGATAATC	NcoI BamHI
11.	Cbs2p	15-389	CCATGGATCCATGACGTACTTACTAGC CCTTGGATCCTCACAGGTAATGATAATC	NcoI BamHI
12.	Cbs2p	15-302	CCATGGATCCATGACGTACTTACTAGC TAGACGGATCCGTTGGTGTTTAGTGACGGGTAGG	NcoI BamHI
13.	Cbs2p	15-192	CCATGGATCCATGACGTACTTACTAGC TAGACGGATCCACTTTTACCAGTACTACTCATTCG	NcoI BamHI
14.	Cbs2p	147-389	TAGACCCATGGTATTCATGGGCTTTACAACACC CCTTGGATCCTCACAGGTAATGATAATC	NcoI BamHI
15.	Cbs2p	147-302	TAGACCCATGGTATTCATGGGCTTTACAACACC TAGACGGATCCGTTGGTGTTTAGTGACGGGTAGG	NcoI BamHI
16.	Cbs2p	147-192	TAGACCCATGGTATTCATGGGCTTTACAACACC TAGACGGATCCACTTTTACCAGTACTACTCATTCG	NcoI BamHI
17.	Cbs2p	233-389	TAGACCCATGGTAGATCTGCATGTTTCATGGTTTCC CCTTGGATCCTCACAGGTAATGATAATC	NcoI BamHI
18.	Cbs2p	233-302	TAGACCCATGGTAGATCTGCATGTTTCATGGTTTCC TAGACGGATCCGTTGGTGTTTAGTGACGGGTAGG	NcoI BamHI

Tab. 3a: **Cbs1p- und Cbs2p-Klonierungen für das Two Hybrid-System**

Die mit Gal4pBD (Vektor pODB80) bzw. Gal4pAD (Vektor pACT2) fusionierten Proteinbereiche von Cbs1p und Cbs2p, die entsprechenden Primer für die PCR-Amplifikation sowie die verwendeten Schnittstellen für die Klonierung in beide Vektoren (pODB80 und pACT2) sind angegeben.

Nr.	Protein	Fusionierte As	PCR-Primer-Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
19.	Nam1p	16-440	GATATCCATGGACATACATTGCATCCATA TACGCTAGGATCCCTACCTGTCTCTAGTTAAAT	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
20.	Mrp10p	1-95	CATCGTCAGGATCCTTAATCATGGGGTTTACC TACACGTCCATGGCCGAAAACCACCAG	<i>BamHI</i> <i>NcoI</i>
21.	Mrp8p	1-219	ACTCGACTGTCGACTTACCATATTTTCGGTTCC ACTCGACTGAGCTCTTACCATATTTTCGGTTCC GCAAGAAGACCATGGCTAACGAAATTGAATTACTG	<i>Sall</i> (pODB8) <i>SacI</i> (pACT2) <i>NcoI</i>
22.	MrpS5p	1-307	TAGGTAACCATGGTCAAGAGGCAATTATCG GTATGTACATGGATCCTCAGCTTGAATAGTAAAC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
23.	MrpS2p	36-400	TCGTCCCGGGTGATGCATTAGGTTCCC CTAGTCTGCAGTTATGTATTTTGCACGG CTAGTGAATTCTTATGTATTTTGCACGG	<i>SmaI</i> <i>PstI</i> (pODB8) <i>EcoRI</i> (pACT2)
24.	Mrp4p	1-395	TCGTACCATGGAGAGACACGTTTTTGCG CTAGTGTGCACTCATTTTTTCGTTATTTCTGG CTAGTGAGCTCTCATTTTTTCGTTATTTCTG	<i>NcoI</i> <i>Sall</i> (pODB8) <i>SacI</i> (pACT2)
25.	MrpS9p	1-278	TCGTACCATGGTTTTCAAGGCTTTCTTTG CTAGTGGATCCCTATCTCTTGACCCATG	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
26.	Mrp13p	38-339	TCGTACCATGGCATCTACCGCGAAATTG CTAGTGTGCACTATTTTTTCCTCTTTTTCG CTAGTCTCGAGCTATTTTTCTCTTTTTCG	<i>NcoI</i> <i>Sall</i> (pODB8) <i>XhoI</i> (pACT2)
27.	Mrp17p	1-131	TCGTACCCGGGAATGCTTTATGAGCTGATC CTAGTGGATCCCTAAATGGATTGATAATC	<i>SmaI</i> <i>BamHI</i>
28.	MrpS18p	60-217	TTATCCCATGGGATCAAATGGTAGTAGTGAG CTAGTGGATCCTCATAGTCTTCTCATCTTTG	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
29.	MrpS28p	34-286	TCGTACCATGGGAAGTGCAAAGCTGTG CTAGTGGATCCCTAAAATGTAGCCC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
30.	Nam9p	39-486	TCGTACCCGGGAAAATCTTTGTATCAACAG CTAGTGTGCACTCATTTACCATTCTCAAG CTAGTGAATTCTCATTTACCATTCTCAAG	<i>SmaI</i> <i>Sall</i> (pODB8) <i>EcoRI</i> (pACT2)
31.	Ymr31p	9-123	TCGTACCATGGGAAAGAGTGCATATGAG CTAGTGGATCCTCACCATGCACCACCGC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
32.	Pet123p	21-318	TCGTACCATGGGTATTCTGAAGAGCC CTAGTGGATCCTTACAAGTTGGTTG	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
33.	Mrp1p	1-321	ATCGACCATGGTTTCGCTTTACTGGTGC ATCGAGGATCCTCATAACGTGTTGAATGC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
34.	Mrp2p	16-115	ATCGACCATGGGGTTTATCAATGCTCGC ATCGAGGATCCTTACCAAATACCCTTCTTAAC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
35.	Mrp21p	1-177	TATCGCCATGGTGAAGAGCACGCTGAGGCTTTC GCATAGGATCCTTAGTATCCTTTCTCTTGGC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
36.	Mrp51p	2-344	TCGTACCCGGGAACATTGGCAGAGTTGCTTGG CTAGAGGATCCTCAATTTCCCTTGATTATATTC	<i>SmaI</i> <i>BamHI</i>
37.	Cbp1p	1-654	GTATGCCCATGGTTTTACCTCGTCTCGTTTCGG TCGACTGAGCTCTCATCTTAAGTAACGTTTGAC CTAGTGTGCACTCATCTTAAGTAACGTTTGAC	<i>NcoI</i> <i>SacI</i> (pACT2) <i>Sall</i> (pODB8)
38.	Phb1p	2-287	TCGATCCATGGGTATGTCTAATTCTGCCAAAC AGCTAGGATCCTTAACGGCCAATGTTC	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>
39.	Phb2p	1-315	TCGATCCATGGGTATGAATAGATCACCTGGTG ATCGAGGATCCTAGCCTTCGCTATTTATTTG	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>

Nr.	Protein	Fus. As	PCR-Primer-Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
40.	Cbp6p	1-163	TAGACCCATGGCTTCTTCCCAGGTC	<i>NcoI</i>
			TCGATGGATCCTTATTTACCAATAAT	<i>BamHI</i>
41.	Tim13p	1-105	GTCATCCATGGGTCTATCATCTATCTTTGG	<i>NcoI</i>
			GATCGGATCCTTAGATTTGCGCAGAAGCGG	<i>BamHI</i>
42.	Pet122p	1-254	GTA TCCATGGTGACTATCACGAAAAG	<i>NcoI</i>
			CATCAGGATCCTTATGTGTTGATTTTC	<i>BamHI</i>
43.	Pet54p	1-293	GTA TCCATGGAGGCTTCTAGTAAAGC	<i>NcoI</i>
			CATCAGGATCCTCATTCACTAAGATGTTTC	<i>BamHI</i>
44.	Pet494p	1-489	GTA TCCATGGATTTGAAAAGGGG	<i>NcoI</i>
			CATCAGGATCCTTAAGAAGAGTCCGCCTGG	<i>BamHI</i>
45.	Abc1p	1-501	GCTACCATGGTTACAAATATGGTGAAATTGAG	<i>NcoI</i>
			CTGGATGTCGACTTAAACTTTATAGGC	<i>SalI</i> (pODB80)
			GGATGAATTCTTAAACTTTATAGGC	<i>EcoRI</i> (pACT2)
46.	Abc1p	48-501	GCTACCATGGAAGGTGAAGAAAACG	<i>NcoI</i>
			CTGGATGTCGACTTAAACTTTATAGGC	<i>SalI</i> (pODB80)
			GGATGAATTCTTAAACTTTATAGGC	<i>EcoRI</i> (pACT2)
47.	Qcr6p Δ C	26-102	TATATACCATGGAAGATGACGATAACGAGCAG	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCAAGCACACTCCTCGTAGTGGTG	<i>BamHI</i>
48.	Qcr6p	26-147	TATATACCATGGAAGATGACGATAACGAGCAG	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCACTTTAATTTGTCAAATAATCTA	<i>BamHI</i>
49.	Cyt1p	62-309	TATATACCATGGGTACCGCAGCTGAACACGGATTGCAC	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCACTTTCTTGGTTTGGTGGATT	<i>BamHI</i>
50.	Qcr7p	2-127	TATATACCATGGGTCCACAGTCTTTTACGTCTATTGCG	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCATTTTGGAGACCTCTATGTTGTC	<i>BamHI</i>
51.	Qcr9p	2-66	TATATACCATGGGTTCTTTTTCATCACTATATAAAACC	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCACTCATCATCGTCTCCATC	<i>BamHI</i>
52.	Qcr10p	2-80	TATATACCATGGCGTACACTTCTCATCTGTCTTCA	<i>NcoI</i>
			TATATAGGATCCTTATCAATTAGGTTTATCTTCTGGTGG	<i>BamHI</i>
53.	Rip1p	31-215	TATATAGGATCCTGAAATCCACGTACAGGACC	<i>BamHI</i>
			TATATAGAGCTCTTATCAACCAACAATGACCTTATCACC	<i>SacI</i> (pACT2)
			TATATAGTCGAGTTATCAACCAACAATGACCTTATCACC	<i>SalI</i> (pODB80)

Tab. 3b (S. 39-40): **Klonierungen für das Two Hybrid-System**

Die fusionierten Proteine und die Primer für die entsprechenden PCR-Amplifikationen sind aufgeführt. Die Klonierungen erfolgten unter Verwendung der angegebenen Schnittstellen in die Vektoren pODB8 bzw. pACT2.

Für den Interaktionstest wurden die beiden Fusionspartner entweder durch Co-Transformation (s. 2.2.2.6) oder Kreuzung der Stämme Y187 bzw. HF7c, die zuvor einzeln mit den Plasmiden pODB8/80 bzw. pACT2 (s. 2.2.1.2) transformiert worden waren, zusammengebracht. Die Tabellen 3a und 3b zeigen im Überblick die in dieser Arbeit verwendeten Two Hybrid-Interaktionspartner und deren Klonierung. Alle Plasmidkonstrukte wurden sequenziert, um eine fehlerfreie DNA-Sequenz und „in frame“ Fusion zu bestätigen.

2.2.2.14.3 β -Galaktosidase-Assays

„colony-lift“-Filter-Assay

Für diesen qualitativen Test wurden die Co-Transformanden (s. 2.2.2.14.2) erneut auf Selektivmedium ausgestrichen und nach 1 bis 2 Tagen Inkubation bei 30°C verwendet.

Pro Platte wurde ein steriler Filter (Whatman #5) in je einer Petrischale mit 2 ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung (frisch ansetzen) getränkt. Je ein weiterer Filter wurde mit einer sterilen Pinzette auf die Oberfläche der Platte mit den zu testenden Kolonie-Ausstrichen gelegt und mit einem Spatel gleichmäßig angedrückt. Der Filter mit dem daran haftenden Zellmaterial wurde für ca. 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht und danach bei RT zum Auftauen ausgelegt. Der Filter wurde anschließend (Kolonien nach oben) luftblasenfrei auf den Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filter gelegt und die verschlossenen Petrischalen bei 30°C inkubiert. Die mit den Positivkontrollen pCL1 (Insert: Gal4p; ClonTech) bzw. pVA3+pTD1 (Interaktionskontrolle; Inserts: As 72-390 des Maus-p53-Proteins bzw. As 84-708 des SV40 „large T-antigen“; ClonTech) transformierten Kolonien zeigten nach 20 min bzw. 1 h eine deutliche Blaufärbung. Als Negativkontrollen wurden die Plasmide der Gal4pBD-Fusionen bzw. Gal4pAD-Fusionen separat transformiert.

Z-Puffer /X-Gal-Lösung:	Z-Puffer (s. 2.1.11)	100 ml
	β -Mercaptoethanol	0,27 ml
	X-Gal (20 mg/ml in DMF)	1,67 ml

Chemolumineszens-Assay

Für diesen Test wurde das Chemolumineszens-System GalScreen™ (Tropix) verwendet. 100 μ l der zu testenden Zellsuspension (logarithmische Phase) wurden in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 100 μ l Lysepuffer+Substrat entsprechend den Angaben des Herstellers vermischt. Die Auswertung erfolgte nach 30 min bzw. 1 h Inkubation bei 30°C mittels des Multilabel Counters (Wallac 1420). Auf jeder Mikrotiterplatte wurden sowohl die Kontrollen als auch eine Verdünnungsreihe

gereinigter β -Galaktosidase (Boehringer, Mannheim; 0,5-50 ng Protein) zur Eichung und Reproduzierbarkeit der Messungen mitgeführt.

2.2.2.14.4 Nachweis der Aktivierung des *HIS3*-Reportergen

Die zu testenden Transformanten wurden erneut auf Selektivmedium (-Trp; -Leu) mit Histidin ausgestrichen, nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C auf Platten mit Selektivmedium ohne Histidin überstempelt und für 2-7 Tage bei 30°C inkubiert. Beim Screening von cDNA-Two Hybrid-Banken wurde der Transformationsansatz (s. 2.2.2.6) direkt auf Selektivmedium (-Trp,-Leu) ohne Histidin ausgestrichen. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot des Transformationsansatzes auf Selektivplatten mit Histidin ausgespatelt. Klone, die innerhalb von 2-7 Tagen Inkubation bei 30°C aufwuchsen, wurden als „His⁺“ klassifiziert.

Das Screening von Interaktionspartnern durch Kreuzungskombination wurde wie folgt durchgeführt:

Die Transformanten wurden auf entsprechend supplementierten Minimalmedium selektiert. Jeweils 5 ml Selektivmedium wurden inokuliert und üN inkubiert. Für die Kreuzung der Y187- bzw. HF7c-Transformanten wurden in die Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte je 100 μ l YPD-Medium vorgelegt und mit jeweils 50 μ l der Übernachtskultur einer HF7c- und Y187-Transformante versetzt. Die verschlossene Mikrotiterplatte wurde bei 30°C üN inkubiert. Der Erfolg der Kreuzung wurde stichprobenartig mikroskopisch kontrolliert.

Anschließend wurden zunächst mit einer 8-Kanalpipette je 10 μ l der Kreuzungssuspension auf Minimalmediumplatten ohne die As Leucin und Tryptophan pipettiert, um die Diploidisierung und damit die Präsenz beider Two Hybrid-Plasmide zu bestätigen. Zum Nachweis der Aktivierung des Reportergen *HIS3* wurden parallel je 10 μ l der Kreuzungsansätze auf Minimalmediumplatten ohne die As Leucin, Tryptophan und Histidin pipettiert.

Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Kreuzungskombinationen, bei denen auf dem Selektivmedium ohne Histidin innerhalb von 7 Tagen ein Wachstum der Diploiden

beobachtet werden konnte, wurden für den zweiten Reporter-gen-Assay (*lacZ*) ausgewählt.

Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT, Sigma):

3-AT fungiert als kompetitiver Inhibitor des von *HIS3* kodierten Enzyms (His3p) und wurde zur Reduzierung des Hintergrundwachstums auf den Selektivplatten ohne Histidin eingesetzt. Stammabhängig wurde 3-AT in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt:

Y190: 25 mM 3-AT

HF7c: 5 mM 3-AT

Bei Einsatz des diploiden Stammes, der aus der Kreuzung von Y187 und HF7c hervorging (s. 2.2.1.2), wurde kein 3-AT verwendet.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Zellorganellen

2.2.3.1.1 Isolation von Mitochondrien aus Hefezellen (Daum *et al.*, 1982)

(Großmaßstab)

Da die Stämme, die sich vom DBY747 ableiten, ein stark reduziertes bzw. kein Wachstum auf Galaktose aufweisen (s. 3.1.2), wurden die Zellen atmungsdefekter Stämme in Raffinosemedium propagiert. Lactatmedium wurde für die Anzucht atmungskompetenter Stämme verwendet. Die erste Vorkultur (10-50 ml) in Medien mit Glucose wurde üN inkubiert und zur Inokulation einer 2. Vorkultur (50-500 ml) mit dem Medium, welches auch für die Hauptkultur verwendet werden soll, eingesetzt. Die Hauptkultur (1-3 l) wurde am darauffolgenden Tag mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft und üN unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 3000xg, 5 min (Avanti J25, Beckman, Rotor JLA 10500). Anschließend wurden die Zellen mit dH₂O gewaschen und nach Zentrifugation (5 min, 3000xg) das Zellnassgewicht (ZNG) bestimmt. Für die Sphäroplastierung wurde das Zellpellet zunächst in Puffer A resuspendiert (ZNG/0,5 = ml Puffer A), mit 1,54 mg DTT/1 ml Puffer A versetzt und 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5 min, 3000xg, RT; Sigma 3K30, Rotor 12150-H) und mit ca. 30 ml Puffer C gewaschen. Das Pellet wurde danach in Puffer B aufgenommen (ZNG/0,15 = ml Puffer B), 2 mg Zymolyase 20T/g ZNG hinzugegeben und für 30 bis 60 min bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplastierung wurde photometrisch verfolgt.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis. Die Sphäroplasten wurden bei 3000xg, 5 min, 4°C pelletiert und in ca. 30 ml Puffer C gewaschen. Für den Zellaufschluss wurde das Sphäroplasten-Pellet 3x in Puffer D mit Zusatz von 1 mM PMSF (frisch dazugeben) im Dounce-Homogenisator (15 ml, Wheaton, USA) gepottert. Dazu wurde das Pellet in ca. 10 ml Puffer D mit 1 mM PMSF resuspendiert, in den Potter überführt, 15x gepottert und das Homogenisat in SS34 Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (3000xg, 5 min, 4°C). Die Überstände wurden gesammelt und das Pellet erneut gepottert. Nach dem letzten Pottersschritt wurde der Potter mit Puffer D nachgespült.

Die Mitochondrienfraktion wurde bei 12000xg, 10 min, 4°C sedimentiert. Der Überstand enthält Cytosol und Mikrosomen. Das Pellet wurde in ca. 30 ml Puffer D (+ 1 mM PMSF) vorsichtig aufgenommen und bei 3000xg, 5 min, 4°C die Reste an Zellfragmenten entfernt. Der Überstand wurde in ein neues SS34 Zentrifugenröhrchen überführt und die Mitochondrien pelletiert (12000xg, 10 min, 4°C). Das Pellet mit den Mitochondrien wurde in ca. 100-300 µl Puffer D aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für Experimente mit Proteinase K wurden die Mitochondrien sofort verwendet.

Puffer A:	0,1 M Tris/SO ₄ , pH 9,4
Puffer B:	1,2 M Sorbitol; 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Puffer C:	1,2 M Sorbitol
Puffer D:	0,65 M Mannitol; 10 mM Tris/HCl, pH 7,4

2.2.3.1.2 Isolation von Mitochondrien aus Hefezellen (Minimaßstab)

Für viele Fragestellungen ist die Präparation von Mitochondrien aus kleinen Kulturvolumina (20-100 ml) hinreichend. Die Isolation unterscheidet sich von der unter 2.2.3.1.1 beschriebenen Vorgehensweise im wesentlichen durch die Art des Aufschlusses. Nach der Ernte der Zellen bei 3000xg, 5 min, RT (Sigma 3K30, Rotor 12150-H) wurden diese in dH₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl MTE-Puffer (0,65 M Mannitol; 20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; PI-Mix; 4°C) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 400 µl Glasperlen (entsprechend der Maßeinteilung auf dem Eppendorfgefäß) pipettiert. Nach 5minütigem kräftigen „Vortexen“ (4°C) wurde das Gefäß zur Sedimentation der Glasperlen auf Eis gestellt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die Glasperlen mit 500 µl MTE-Puffer gewaschen und die Überstände vereinigt. Nach der Abtrennung von unaufgeschlossenen Zellen und Zellfragmenten (3500xg, 3 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert. Die mitochondriale Fraktion wurde bei 13000xg; 15 min; 4°C pelletiert und die cytosolische Fraktion (Überstand) abpipettiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit MTE-Puffer überspült, um die lockere weiße Schicht zu entfernen. Das Mitochondrienpellet wurde in 50-100 µl MTE-Puffer aufgenommen.

2.2.3.1.3 Isolation von Zellkernen aus Hefezellen (Allen and Douglas, 1989).

Die Hefezellen wurden in 300 ml Selektivmedium üN kultiviert und durch Zentrifugation (3000xg, 3 min, Avanti J25, Beckmann, Rotor JLA10500) geerntet. Die Präparation der Sphäroplasten erfolgte wie bereits beschrieben (2.2.3.1.1). Die pelletierten Sphäroplasten wurden in 1 ml Ficoll-Puffer (18 % Ficoll 400; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 20 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; frisch zusetzen: 3 mM DTT und PI-Mix) resuspendiert, in einen 3 ml Glaspotter (Braun) überführt und durch 15x Pottern aufgeschlossen. Der Potterinhalt wurde mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 5000xg für 15 min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und erneut zentrifugiert (20000xg, 20 min, 4°C). Das Pellet (rohe Kern-Fraktion) wurde in 0,3 ml „storage“-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10 % Glycerol; 100 mM KCl; frisch zusetzen: 1 mM DTT und PI-Mix) aufgenommen und mit einem Homogenisator im Eppendorfgefäß resuspendiert. Diese Suspension wurde in ein 5 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt und darin mit 2,2 ml „storage“-Puffer vermischt. Zu dieser 2,5 ml Suspension wurden 2,5 ml 66 %iges Ficoll 400 gegeben und ebenfalls vermischt. Ein Percollgradient wurde durch Zentrifugation bei 18000xg (13000 U/min; Optima^{Max}, Beckmann-Coulter, Rotor MLS 50) für 35 min (4°C) aufgebaut. Die Bande gereinigter Kerne in Nähe der Gradientenoberfläche wurde mit einer Pipette abpipettiert und 3fach mit Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 10 mM Kaliumacetat; frisch zusetzen: 1 mM DTT und PI-Mix) verdünnt. Die Kerne wurden durch Zentrifugation bei 13000xg für 10 min (4°C) pelletiert, in 100 µl „storage“-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Präparation der Kerne wurde fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Färbung kontrolliert. Dazu wurde die Zellkernsuspension auf einem Objektträger mit DAPI-Lösung versetzt (2 µg/ml) und 10 min inkubiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm.

2.2.3.2 Gesamtzell-Proteinextraktion mit UREA/SDS

Für die Proteinextraktion wurde eine 50 ml YPD-Hauptkultur mit 5 ml einer Übernachtskultur (Selektivmedium) angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (220–250 U/min) inkubiert.

Bei einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 erfolgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 3000xg für 5 min bei 4°C. Das Pellet wurde mit 50 ml eiskaltem sterilen Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert.

Zu den Proben wurden pro 7,5 OD_{600} -Einheiten (die Gesamt- OD_{600} -Einheiten der Kultur berechnen sich aus der OD_{600} einer 1 ml Probe x Gesamtvolumen der Kultur) 100 µl auf 60°C vorgewärmter Cracking-Buffer und 80 µl Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) zugegeben, für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend 1 min kräftig „gevortext“, um die Zellen aufzubrechen.

Die Zelltrümmer und nicht aufgebrochenen Zellen wurden in einer Tischzentrifuge bei 14000 U/min für 5 min bei 4°C pelletiert, die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis belassen. Einer Inkubation der Pellets für 3–5 min bei 100°C folgte ein erneutes kräftiges „Vortexen“ für 1 min und ein Zentrifugationsschritt für 5 min mit 14000 U/min bei 4°C.

Nach dem Vereinigen der beiden Überstände wurden die Proben 5 min aufgekocht und entweder sofort auf ein PAA-Gel geladen oder bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Hochsalzbehandlung und alkalische Extraktion von Proteinen (Carbonatextraktion; Fujiki *et al.* 1982)

Etwa 100 µg Mitochondriensuspension wurden sedimentiert (12000xg, 10 min, 4°C) und in 500 µl eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4, mit oder ohne Zusatz von 1 M NaCl bzw. in 500 µl 0,1 M Na_2CO_3 , pH 11,5, aufgenommen und mit PI-Mix versetzt. Die Proben mit Tris/HCl-Puffer wurden zusätzlich mit Ultraschall (5x 5 s, dazwischen 30 s auf Eis, 50 % Zyklusdauer, 80 % Leistung Sonoplus HD2070 Bandelin) aufgeschlossen. Nach Inkubation auf Eis (1 h) wurden die Proben mit 4,5 ml des entsprechenden Puffers (mit PI-Mix) aufgefüllt und in 5 ml Ultrazentrifugenröhrchen zentrifugiert (220000xg [45000 U/min], 1 h, 4°C, Optima^{Max}, Beckmann-Coulter, Rotor MLS-50). Die Proteine der unlöslichen Fraktion (Pellet) wurden in 1 ml eiskaltem 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 resuspendiert und wie die Proteine des Überstandes mit TCA (10 % Endkonzentration) gefällt. Die Proteine wurden sedimentiert (20000xg, 30 min, 4°C), 2x mit 80 %igem Aceton (-20°C) gewaschen, in 1x Probenpuffer aufgenommen und quantitativ auf ein 15 %iges PAA-Gel aufgetragen.

2.2.3.4 Proteinase K-Behandlung von Mitochondrien

Mitochondrien wurden isoliert, in Puffer D aufgenommen (s. 2.2.3.1.1) und mit eiskaltem 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA Puffer auf eine Endkonzentration von 0,1 M Mannitol verdünnt. Die Mitoplastierung erfolgte für 30 min auf Eis. Aliquots der „shocked mitochondria“ (ca. 100 µg mitochondriales Protein) wurden mit steigenden Konzentrationen an Proteinase K jeweils in An- oder Abwesenheit von 1 % Triton X-100 versetzt und auf ein Reaktionsvolumen von jeweils 100 µl mit 0,65 M Mannitol in 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 aufgefüllt.

Der Proteinase K-Verdau wurde nach 30 min auf Eis durch Zusatz des Proteinaseinhibitor-Mix gestoppt. Die Proben wurden zentrifugiert (20000xg, 10 min), das Pellet in 1x Probenpuffer aufgenommen und sofort hitzedenaturiert (5 min, 100°C).

2.2.3.5 Lipasebehandlung von mitochondrialen Proteinen

Zum Test einer putativen Phospholipid-Verankerung von Proteinen wurden mitochondriale Lysate nach der Methode von Müller and Bandlow, 1989b mit verschiedenen Phospholipasen (PL) inkubiert:

		1	2	3	4
Mitochondrien µl		15	15	15	15
1 M MOPS/KOH, pH 8,0		6	-	6	6
1 M KPi, pH 5,6		-	6	-	-
1 M CaCl ₂		22	22	-	-
0,1 M ZnCl ₂		-	-	6	-
0,1 M MgCl ₂		-	-	-	15
Phospho- lipase	D (2,5 U/µl)	-	10	-	-
	C (2,5 U/µl)	-	-	10	-
	A ₂ (2,5 U/µl)	-	-	-	10
ddH ₂ O		257	247	263	254

Mitochondrien (ca. 300 µg Protein pro Ansatz) wurden entsprechend der Tabelle (S. 48) mit Puffer (+PI-Mix) und den benötigten Co-Faktoren versetzt und durch Ultraschall (5x 5 s, dazwischen 30 s auf Eis, 50 % Zyklusdauer, 80 % Leistung Sonoplus HD2070 Bandelin) aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Phospholipasen zugegeben und für 30 min bei 30°C inkubiert.

Durch anschließende Ultrazentrifugation wurden lösliche von unlöslichen Proteinen (220000xg [45000 U/min], 1 h, 4°C, Optima^{Max}, Beckmann-Coulter, Rotor MLS 50) getrennt. Beide Fraktionen wurden, wie bereits beschrieben (s. 2.2.3.3), weiter behandelt.

2.2.3.6 GST-„pull-down“-Experimente

2.2.3.6.1 Überexpression und Aufreinigung von GST::Nam1p

Für die Fusion von Nam1p(16-440) an GST wurde das *NAM1*(16-440) enthaltende Insert mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BamHI* aus dem Vektor pODB8-Nam1p(16-440) (s. 2.2.2.14.2) herausgeschnitten und in den Vektor pGEX4T3 umkloniert. Da dieser Vektor über keine *NcoI*-Schnittstelle verfügt, wurde diese durch molekularbiologische Techniken so eingeführt, dass sich das ATG-„Codon“ innerhalb der *NcoI*-Schnittstelle (CC**ATG**GG) „*in frame*“ zum Leserahmen von GST befindet. Somit sollte ein unkompliziertes Umklonieren von Inserts aus Two Hybrid-Vektoren gewährleistet werden. Das resultierende Plasmid pGEX4T3-Nam1p(16-440) wurde in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21 transformiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Western-Analyse verifiziert und ein geeigneter Klon für die Proteinaufreinigung ausgewählt.

Für die Aufreinigung und Kopplung an Glutathion-Sepharose von GST::Nam1p(16-440) wurde eine 500 ml LB^{Amp}-Hauptkultur mit 8 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert (Schüttler). Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 2 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und 1x mit Wasser gewaschen (5000 U/min, 5 min, 4°C, Avanti J25, Beckman, Rotor JLA 10500).

Das Zellpellet wurde anschließend in 15 ml kaltem Lysepuffer (1x PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3; 10 % Glycerol; 1 mM PMSF; PI-Mix) resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) zugegeben. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen (3x 30 s, dazwischen 2 min auf Eis, 50 % Zyklusdauer, 80 % Leistung Sonoplus HD2070 Bandelin) und anschließend pelletiert (3000 U/min, 5 min, Sigma 3K30, Rotor 12150-H). Der Überstand wurde aufbewahrt und das Pellet erneut in 15 ml kaltem Lysepuffer (ohne Triton X-100) resuspendiert und, wie zuvor beschrieben, durch Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation (3000 U/min, 5 min, Sigma 3K30, Rotor 12150-H) wurden die Überstände vereint. Das Zell-Lysat wurde abschließend 20 min bei 20000xg zentrifugiert und der Überstand in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

2.2.3.6.2 Kopplung von GST::Nam1p(16-440) an Glutathion-Sepharose

Für die Kopplung an Glutathion-Sepharose™4B (Amersham Pharmacia Biotech) wurden 600 µl der Sepharose-Suspension (75 %ig) pelletiert (500xg, 5 min) und 3x mit 5 ml 1x PBS gewaschen (Zentrifugationen bei 500xg, 5 min). Die gewaschene Sepharose wurde danach zum Proteinextrakt im Falcon-Röhrchen gegeben und unter leichten Drehbewegungen 1 h bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde die Sepharose pelletiert (500xg, 5 min) und in ca. 200 µl 1x PBS mit PI-Mix resuspendiert. Je ein Aliquot (ca. 10 µl) der Suspension wurde zur Protein-Konzentrationsbestimmung (2.2.3.7.5) bzw. zur Kontrolle im SDS-PAA-Gel eingesetzt.

2.2.3.6.3 Präparation von Hefe-Zell-Lysaten

Für die Bindungsstudien wurden die Gal4pBD-Fusionen verwendet, die für die Analysen mit dem Two Hybrid-System kloniert wurden. Mit einer 5 ml Selektivmedium-Vorkultur (-Trp) des entsprechend transformierten Stammes Y187 wurde eine 50 ml Hauptkultur (gleiches Medium) angeimpft und üN inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 U/min, 5 min, Sigma 3K30, Rotor 12150-H), in 50 ml YPD-Medium aufgenommen und weitere 1,5 h inkubiert.

Danach wurden die Zellen pelletiert (3000 U/min, 5 min, Sigma 3K30, Rotor 12150-H), mit Wasser gewaschen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Zum Zellpellet im Eppendorfgefäß wurden ca. 400 µl Glasperlen (Ø 0,45 mm) und 600 µl Hefe-Lysepuffer (1x PBS; 1 % Triton X-100; PI-Mix) gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min in einer Schwingmühle (Rentsch; MM200). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (20000xg, 5 min, 4°C) in ein neues Eppendorfgefäß überführt, das Pellet mit 600 µl Hefe-Lysepuffer ohne Triton X-100 resuspendiert (1 min „Vortexen“) und erneut zentrifugiert (20000xg, 5 min, 4°C). Die Überstände wurden vereinigt, 15 min bei 20000xg (4°C) zentrifugiert und für die Bindungsstudien eingesetzt.

2.2.3.6.4 *In vitro*-Bindungsassay

Für die Bindung wurde die GST::Nam1p(16-440)-Sephrose-Suspension (entspricht ca. 30 µg gebundenem Protein) zu ca. 200 µl des Hefe-Zell-Lysates gegeben. Die Inkubation erfolgte unter leichten Rotationsbewegungen für 2 h bei 4°C. Die Sephrose wurde pelletiert (500xg, 5 min, 4°C) und 3x mit je 1 ml 1x PBS mit 0,3 % Triton X-100 und PI-Mix gewaschen. Abschließend wurde das Sephrosepellet mit 15 µl 2x Probenpuffer (s. 2.2.3.7.1) versetzt und für die Western-Analyse auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen.

2.2.3.7 Proteinanalyse

2.2.3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen wurde das diskontinuierliche Gelsystem (Laemmli, 1970) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde in Mini-Elektrophoreseeinheiten (9,0 x 7,0 x 0,5 cm) der Firma Hoefer bzw. Bio-Rad durchgeführt. Es wurden in der Regel Trenngele mit einer Konzentration von 12 % bzw. 15 % Acrylamid und 4 %ige Sammelgele verwendet. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt und gegebenenfalls das Gesamtvolumen der Proben angeglichen (10-20 µl). Letzteres verhindert ein ungleiches Laufverhalten im SDS-Gel infolge unterschiedlicher Probenvolumina.

Nach Hitzedenaturierung bei 100°C für 5 min wurden die Proben kurz zentrifugiert (1 min, max. Geschwindigkeit), auf Eis gelagert und auf ein PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei 80 V (Sammelgel) bzw. 100-150 V im Trenngel (Stromstärke nicht höher als 20 mA). Die Proteine im PAA-Gel wurden -falls erforderlich- mit Coomassie® Brillantblau G250 gefärbt.

Acrylamidlösung: Acrylamid 30 %/Bisacrylamid 0,8 % (Roth)
 4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
 4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
 1x Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
 pH 8,3 (nicht einstellen!)
 2x Probenpuffer: 2 % SDS; 4 % β -Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 4 mg
 Bromphenolblau, 1x Sammelgelpuffer

Coomassie® Brillantblau G250-Färbelösung: 42 % Methanol
 17 % Essigsäure
 0,1 % (w/v) Brillantblau G250

2.2.3.7.2 Western Blot (Semi-dry)

Nach erfolgter Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine mittels eines Semi-dry Blotters (Biometra) auf eine PVDF-Membran (Immobilon™-P, Porendurchmesser 0,45 μ m, Millipore) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zunächst kurz in Methanol gespült und anschließend für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die in entsprechender Größe zugeschnittenen Filterpapiere (GB 002, Schleicher & Schuell) wurden ebenfalls in einen Tank mit Transferpuffer gelegt. Das Gel wurde bis zum Zusammenbau des Blots in Transferpuffer gelagert. Fünf Lagen des puffergetränkten Filterpapiers wurden luftblasenfrei auf die Anodenplatte gelegt und die Membran darauf platziert. Über das danach aufgelegte Polyacrylamidgel wurde eine Lage Filterpapier gelegt, die mit der Glaspipette unter leichtem Druck allflächig angepresst wurde. Mit den weiteren Lagen Filterpapier (4) wurde ebenso verfahren. Der Proteintransfer erfolgte für 1 Stunde bei 25 V und 1-1,5 mA pro cm² Gelfläche (üblicherweise 60 mA). Zur Kontrolle des Transfers wurde die PVDF-Membran mit Ponceau S Lösung angefärbt.

1x Transferpuffer: 0,025 M Tris
 0,192 M Glycin
 5,0 % (v/v) Methanol
 0,1 % SDS

Ponceau S Lösung:	0,5 %	Ponceau S
	1,0 %	TCA

2.2.3.7.3 Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran in Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver (Nestlé) in 1x TBS/T) für 1 h bei RT oder üN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit dem primären Antikörper (in 5 % Magermilchpulver in 1x TBS/T, s. 2.1.4) inkubiert und abschließend 3x 15 min mit TBS/T gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 30 min (s. 2.1.4). Die Membran wurde erneut 3x für 15 min in TBS/T gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schütteln bei RT. Die Detektion wurde mit Hilfe des ECL^{plus}-Systems™ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.7.4 Stripping und Reprobing der Membran

Die Membran wurde 30 min bei 50°C unter leichtem Schütteln in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7; 2 % SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol - frisch zusetzen) inkubiert und danach 4x 5 min in 1x TBS/T gewaschen. Die Inkubation der Membran erfolgte 1 h bei RT oder üN bei 4°C in Blockierungslösung. Danach wurden, wie zuvor beschrieben, die Antikörperinkubation und Detektion der Membran durchgeführt (s. 2.2.3.7.3).

2.2.3.7.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit dem Bio-Rad DC-Protein Assay nach Angaben des Herstellers. Für die Kalibrierung wurde BSA verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Replacement des *CBS1*-Gens

Bisherige Untersuchungen zu Cbs1p wurden mit dem Deletionsstamm GDV0 durchgeführt (Rödel *et al.*, 1986). Der Leserahmen für *CBS1* wurde in diesem Stamm (Ausgangsstamm DBY747) durch Insertion einer *URA3* Kasette in die singuläre *EcoRI*-Schnittstelle des Genes disruptiert (Abb. 1). Somit verbleiben 5'-seitig der Schnittstelle 466 Basenpaare (bp) des *CBS1*-ORF. In Northern-Analysen der aus GDV0 präparierten mRNA mit einer *CBS1*-spezifischen Sonde konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich transkribiert wird (Forsbach, 1989).

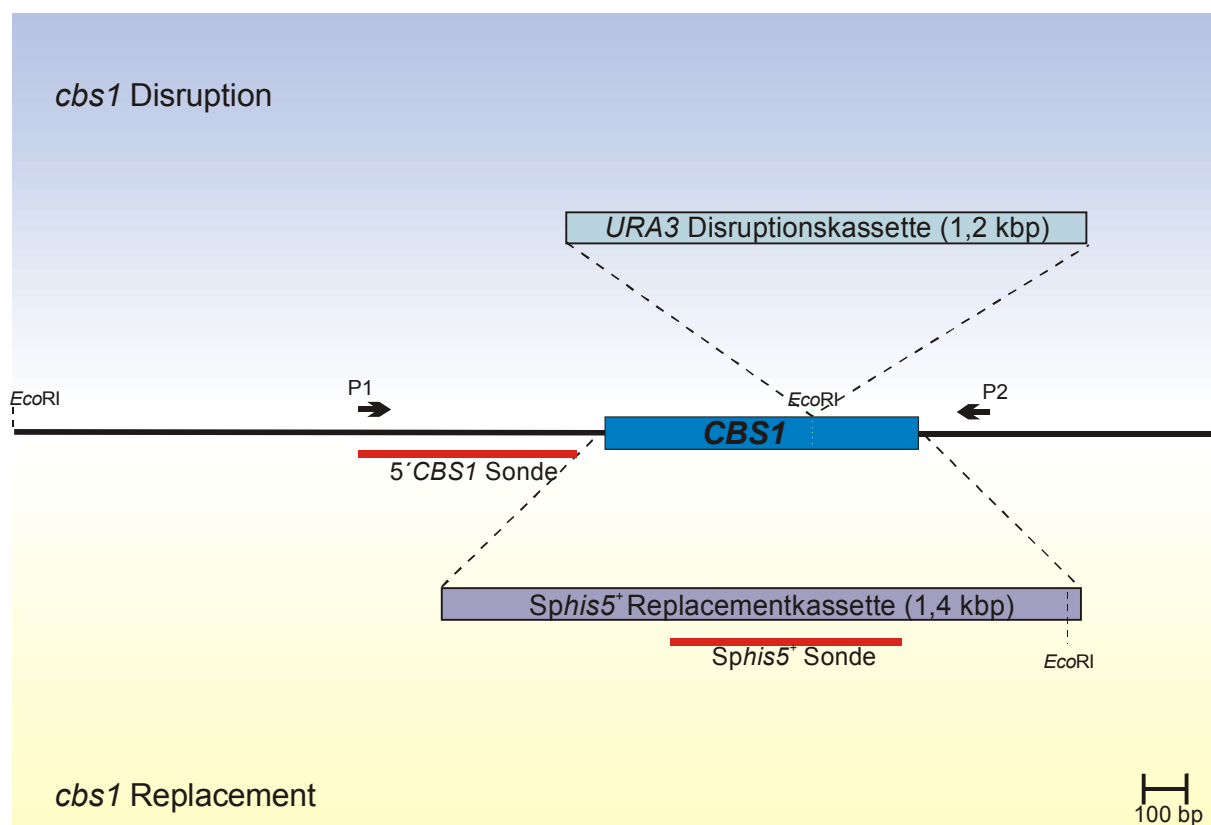


Abb. 1: **Darstellung der Disruption (oben) und des Replacements (unten) des *CBS1*-Gens**

Der Locus des *CBS1*-Genes auf Chromosom IV ist schematisch dargestellt. Die verwendeten Integrationsfragmente sowie die Lage der Primer (P1, P2), Sonden und Schnittstellen des Restriktionsenzymes *EcoRI* sind angegeben.

Die Translation dieses verkürzten *CBS1*-Transkripts würde zu einem Protein führen, welches die 155 N-terminalen Aminosäuren des Cbs1p beinhaltet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Cbs1p-Fragment eine eigenständige, vom C-Terminus unabhängige Funktion ausführt. Aus diesem Grunde wurde ein Stamm (UKB1) konstruiert, in dem der *CBS1*-Leserahmen komplett ersetzt wurde (Abb. 1).

3.1.1 Konstruktion und molekulare Analyse des Stammes UKB1

Die dazu verwendete *Sphis5⁺* Replacementkassette (s. 2.2.2.9) wurde mit SFH-PCR (Wach *et al.*, 1997) amplifiziert und in den Stamm DBY747 transformiert. Es wurden 240 Histidin-prototrophe Transformanten erhalten, deren Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Glycerin-Ethanol-Medium) getestet wurde. Atmungsdefekte Hefen sind nicht in der Lage, auf diesem Medium zu wachsen, da die Verwertung dieser Kohlenstoffquellen eine intakte Atmungskette verlangt. Etwa 80 % der His⁺ Klone zeigten kein Wachstum auf diesem Medium. Da zwei unterschiedliche Kohlenstoffquellen angeboten wurden, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch eine Integration der Replacementkassette in ein für die Glycerin- oder Ethanolverwertung essentielles Gen hervorgerufen wurde. Durch Kreuzung der atmungsdefekten (rd) His⁺ Klone mit einem *rho⁰*-Testerstamm (IL993-5c) und Analyse der resultierenden Diploiden auf nicht-fermentierbarem Medium („*PET*-Test“, s. 2.2.1.1) konnte gezeigt werden, dass der Verlust einer intakten Atmungskette nicht auf ein fehlendes mitochondriales Genom (*rho⁰*) zurückzuführen ist. Die korrekte Integration der *Sphis5⁺* Replacementkassette in den *CBS1*-Locus wurde mittels diagnostischer PCR (Primer P1 (#39) und P2 (#17), Abb. 1) überprüft. Die getesteten Klone zeigten das entsprechende DNA-Fragment in erwarteter Länge (s. Abb. 1 und 2(A)). Das ca. 1,3 kbp lange Fragment aus dem Wildtypstamm DBY747 wird durch die Insertion der *URA3* Kassette im Disruptionsstamm GDV0 um ca. 1,2 kbp verlängert. Ein Replacement des *CBS1*-Wildtypallels durch die *Sphis5⁺* Replacementkassette führt zu einem PCR-Produkt von 2012 bp (Abb. 2(A)). Zur Bestätigung der korrekten Integration durch Southern-Hybridisierung wurde von einem ausgewählten Klon (5-3) die genomische DNA präpariert.

Zum Vergleich wurde genomische DNA des Ausgangsstammes DBY747 eingesetzt. Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

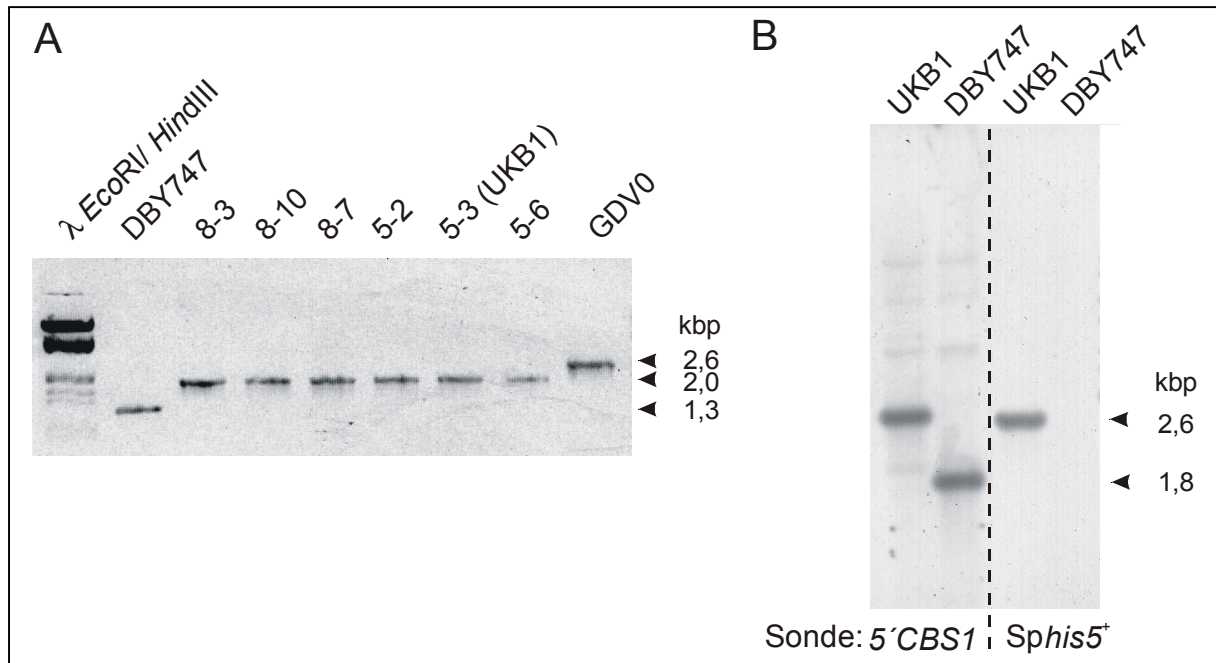


Abb. 2: Diagnostische PCR von Histidin-prototrophen Transformanten mit den Primern P1 (#39), P2 (#17) (A) und Southern-Analyse des $\Delta cbs1$ -Stammes UKB1 (B)

Genomische DNA des Wildtypstammes DBY747 (A und B) bzw. des *cbs1*-Disruptionstammes GDV0 (A) dienen als Kontrollen. Die verwendeten Sonden und die Längen der detektierten Fragmente sind angegeben.

Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten Sonden (5'CBS1 und Sphis5⁺), deren Bindungsstellen in Abb. 1 dargestellt sind. Während im Stamm UKB1 durch beide Sonden ein 2600 bp langes Fragment detektiert wird (Abb. 2(B)), das die korrekte Integration des Replacementfragments bestätigt, liefert die Hybridisierung der Wildtyp (wt)-DNA mit der 5'CBS1 Sonde ein ca. 1780 bp langes Fragment, welches durch die CBS1-interne *EcoRI*-Schnittstelle entsteht (vgl. Abb. 1). Die Sphis5⁺ Sonde gibt erwartungsgemäß kein Signal mit wt-DNA (Abb. 2(B)). Damit konnte bewiesen werden, dass im Stamm UKB1 der komplette Leserahmen des CBS1-Gens durch die Sphis5⁺ Replacementkassette ersetzt wurde und dass diese Integration ausschließlich auf diesen Locus im Genom beschränkt ist.

Nach der genotypischen Analyse des Stammes UKB1 erfolgte die phänotypische Charakterisierung im Vergleich mit dem Disruptionsstamm GDV0.

3.1.2 Der Phänotyp des Hefestammes UKB1

Besonderes Augenmerk wurde beim Vergleich der beiden Stämme auf den möglichen Einfluss des den *CBS1*-Leserahmen überlappenden ORF YDL068w gelegt. Aus diesem Grunde wurden zusätzliche phänotypische Analysen durchgeführt, die das Wachstum sowohl unter verschiedenen osmotischen Bedingungen als auch mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen beinhalten. Die Disruption bzw. das Replacement des *CBS1*-Leserahmens interferiert in unterschiedlichem Maße mit der Integrität des „questionable“ ORF YDL068w (Abb. 3).

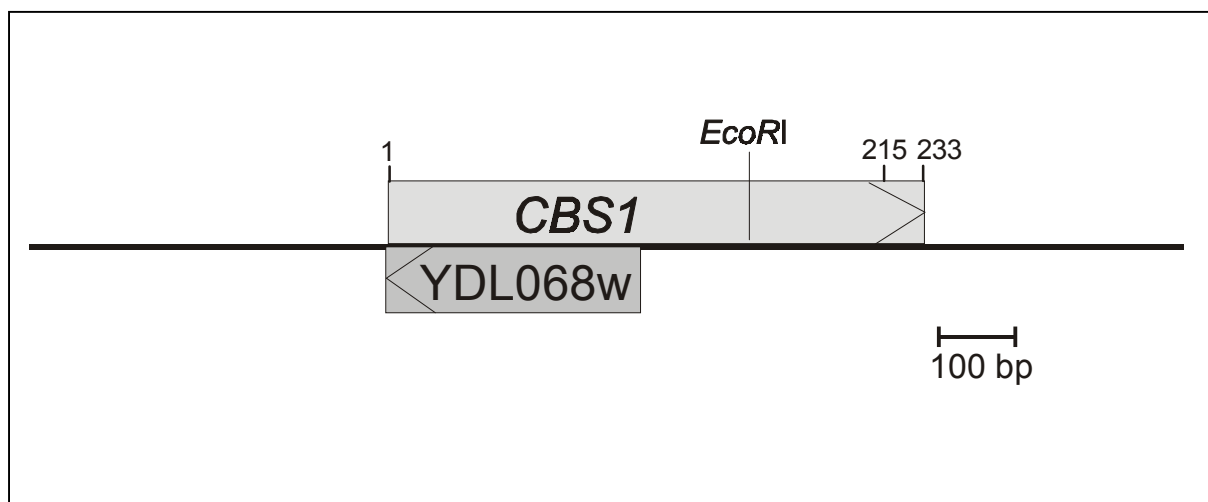


Abb. 3: **Schematische Darstellung der genomischen DNA-Region mit der Überlappungszone der Leserahmen von *CBS1* und YDL068w**

Die eingetragene *EcoRI*-Schnittstelle wurde für die Insertion der Disruptionskassette im Stamm GDV0 verwendet. Die Positionen der Aminosäuren 1, 215 und 233 von Cbs1p sind angegeben.

Während im GDV0 allenfalls Bereiche des Promotors zerstört sind, fehlt im UKB1 der komplette YDL068w-Leserahmen. Daher war nicht auszuschließen, dass im UKB1 zusätzliche Effekte auftreten, die auf den Ausfall des von YDL068w kodierten Proteins und nicht auf den Ausfall von Cbs1p zurückzuführen sind.

Für diese Analysen wurden die Stämme DBY747, GDV0 und UKB1 jeweils mit dem insertfreien Vektor (pRS415) oder mit Plasmiden, die entweder den vollständigen Leserahmen des Cbs1p (pRS415 Cbs1) oder eine C-terminal verkürzte Variante des Cbs1p (pRS415 Cbs1 Δ (215-233), siehe Abb. 3 und 17) unter Kontrolle des authentischen Promotors tragen, transformiert. Das C-terminal trunkierte Cbs1-Protein (Cbs1p Δ (215-233)) ist nicht in der Lage, die *cbs1*-Nullmutante zu komplementieren (vgl. 3.3.2.2.1). Mit der Transformation dieses Plasmides wird aber eine vollständige Kopie des YDL068w-Leserahmens inklusive des 5'-seitig flankierenden Bereiches eingeführt und lässt möglicherweise YDL068wp-spezifische Effekte erkennen. Je 10 Transformanden wurden auf Selektivmedium ausgestrichen und nach 2 Tagen Wachstum bei 30°C auf die entsprechenden Medien zur Überprüfung des Wachstums auf vergärbare, nicht-vergärbare und osmotischen Stress induzierende Medien überstempelt. Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse sind in Tab. 4 zusammengefasst.

UKB1 und GDV0 unterscheiden sich nicht im Wachstum auf Medien mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen

Weder die Disruption noch das Replacement des *CBS1*-ORF zeigen einen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum auf glucosehaltigem Medium im Vergleich zum Ausgangsstamm DBY747 (Tab. 4). Im DBY747 selbst kommt es auch durch die zusätzliche Kopie eines *CBS1*-Wildtypalleles (pRS415 Cbs1) bzw. des mutierten Alleles (pRS415 Cbs1 Δ (215-233)) zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums. Im letzteren Fall kann somit ein dominant negativer Effekt ausgeschlossen werden.

Normalerweise zeigen Hefestämme auf vergärbaren Medien, die Glucose, Galaktose oder Raffinose enthalten, ein vergleichbares Wachstum. Im untersuchten Fall allerdings fällt die deutlich schlechtere Verwertung der Kohlenstoffquelle Galaktose auf. Aufgrund des stark reduzierten Wachstums werden die Kolonien erst nach längerer Inkubation (7 Tage) sichtbar. Dieses Wachstum zeigt sich interessanterweise aber nur bei den zur Atmung befähigten Transformanden. Offenbar liegt schon im Ausgangsstamm (wenigstens) eine sekundäre Mutation vor, die den Galaktosestoffwechsel beeinflusst. Die näheren Zusammenhänge zwischen Galaktoseverwertung und Respiration werden im Diskussionsteil erläutert.

Stamm	Plasmid	Kohlenstoffquelle											
		Glucose	Raffinose	Galaktose	Ethanol	Lactat	Glycerin/ Ethanol			Glucose			
							Inkubations- temperatur			+NaCl		+Sorbitol	
							23°C	30°C	37°C	0,3M	1M	0,5M	1,5M
DBY747	pRS415	+++	+++	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+
	pRS415 Cbs1	+++	+++	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+
	pRS415 Cbs1 $\Delta(215-233)$	+++	+++	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+
GDV0	pRS415	+++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	pRS415 Cbs1	+++	+++	+	++	++	++	++	+	+	+	+	+
	pRS415 Cbs1 $\Delta(215-233)$	+++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
UKB1	pRS415	+++	++	-	-	-	-	-	-	++	+	++	+
	pRS415 Cbs1	+++	+++	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+
	pRS415 Cbs1 $\Delta(215-233)$	+++	++	-	-	-	-	-	-	++	+	++	+

Tab. 4: **Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen, Temperaturen und osmotisch aktiver Substanzen auf das Wachstum der $\Delta cbs1$ -Stämme GDV0 und UKB1 sowie des wt-Stammes DBY747**

Die Stämme wurden mit insertfreiem Plasmid pRS415 bzw. mit Plasmiden, die das *CBS1* wt- oder das C-terminal verkürzte Allel (*Cbs1* $\Delta(215-233)$) tragen, transformiert. Die Auswertung erfolgte nach 2 bzw. 7 Tagen (*) Inkubation unter den angegebenen Bedingungen: „+++“ wt-entsprechendes, „++“ reduziertes, „+“ stark reduziertes bzw. „-“ kein Wachstum.

UKB1 und GDV0 unterscheiden sich nicht im Wachstum auf Medien mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen

Der Ausfall des *Cbs1* Proteins führt in letzter Konsequenz zum Verlust der Fähigkeit, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen, da deren Katabolismus eine intakte Atmungskette - also den Transport von Elektronen zum Endakzeptor Sauerstoff - verlangt. UKB1 und GDV0 sind nicht in der Lage, auf Medien mit Ethanol, Glycerin oder Lactat als C-Quelle zu wachsen (Tab. 4).

Die Einführung einer plasmidkodierten Kopie des *CBS1*-Leserahmens mit authentischem Promotor (pRS415 Cbs1) komplementiert in beiden Stämmen diesen Wachstumsdefekt.

Dabei konnten im Vergleich der entsprechenden transformierten und untransformierten Stämme keine Unterschiede bei Variation der Inkubationstemperaturen (23°C, 30°C und 37°C) festgestellt werden.

In Kombination mit den Ergebnissen der Southern-Analyse (3.1.1) kann damit funktionell belegt werden, dass im Stamm UKB1 der *CBS1*-Leserahmen zerstört wurde. Die Ergebnisse zum Wachstum der *cbs1*-Nullmutante UKB1 auf nicht-fermentierbaren Medien stimmen mit dem diesbezüglich bereits beschriebenen Phänotyp des Stammes GDV0 (Rödel *et al.*, 1986) überein.

UKB1 und GDV0 unterscheiden sich nicht signifikant im Wachstum unter osmotischen Stress

Um den Phänotyp der *cbs1*-Nullmutanten besonders in Hinblick auf den Einfluss des putativen Genproduktes des YDL068w-ORF weiter zu charakterisieren, wurde das Wachstum der Stämme auf glucosehaltigem Medium unter Zusatz von NaCl bzw. Sorbitol untersucht. Hohe NaCl-Konzentrationen üben zwei verschiedene Stressbedingungen auf die Hefezelle aus: den osmotischen Stress und die Toxizität der Natriumionen. Sorbitol hingegen vermittelt nur den osmotischen Stress. Das osmotische Stresspotential von 0,3 M bzw. 1 M NaCl ist äquivalent der Wirkung von 0,5 M bzw. 1,5 M Sorbitol (Serrano *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* reagiert auf osmotischen Stress mit der Akkumulation von intrazellulärem Glycerol. Alle hier untersuchten Stämme zeigen, unabhängig vom transformierten Plasmid, eine ähnliche Reaktion auf die Stressoren. Wie erwartet, bewirken höhere osmotische Konzentrationen im Medium eine stärkere Reduktion des Wachstums. GDV0 reagiert dabei vergleichsweise sensibler. Es konnte kein zusätzlich negativer Effekt der eingangs beschriebenen Toxizität der Natriumionen auf das Wachstum beobachtet werden. Es gibt keine Hinweise darauf, dass es durch die Disruption bzw. das Replacement (mit gleichzeitiger Entfernung des überlappenden ORF) des *CBS1*-Allels zu einer Beeinträchtigung der Osmoregulation kommt.

UKB1 und GDVO unterscheiden sich nicht im Cytochrom-Spektrum

Tieftemperatur-Spektren im Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm geben Aufschluss über die Präsenz und relative Menge der proteingebundenen Cytochrome der Zelle.

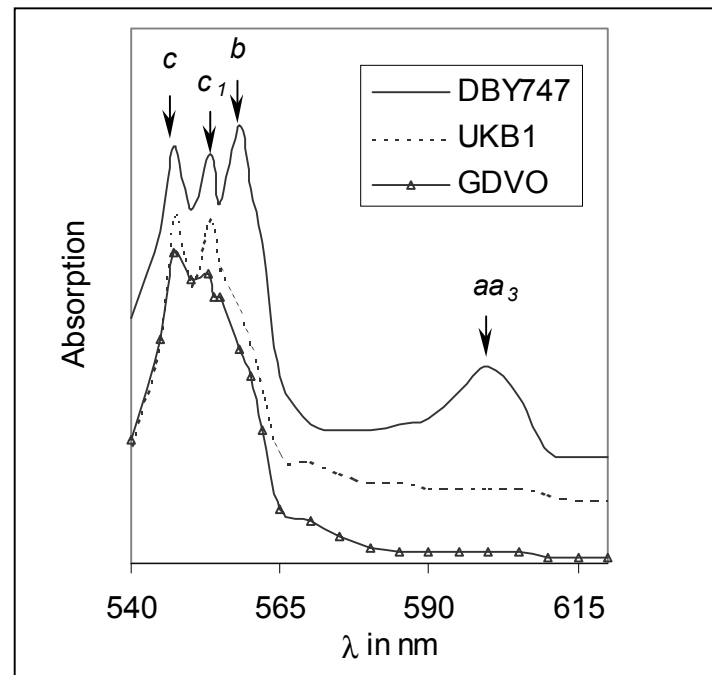


Abb. 4: Tieftemperatur-Spektren der Cytochrome der *cbs1*-Nullmutanten UKB1 und GDVO im Vergleich zum Wildtyp DBY747

Die Zellen wurden in Vollmedium mit 2 % Glucose propagiert. Die Absorptionsmaxima der einzelnen Cytochrome sind gekennzeichnet: „c“=Cytochrom c, „c₁“=Cytochrom c₁, „b“=Cytochrom b, „aa₃“=Cytochrome a und a₃.

Da in Hefen der weitaus größte Anteil der Cytochrome in den Enzymkomplexen der Atmungskette assembliert vorliegt, können anhand der Spektren Rückschlüsse auf die Intaktheit der Atmungskette gezogen werden. In Abb. 4 sind die Cytochromspektren der *cbs1*-Nullmutanten UKB1 und GDVO im Vergleich zum Wildtypstamm DBY747 dargestellt.

Im Spektrum des Wildtypstammes (Abb. 4) lassen sich 4 majore Peaks bei 547 nm, 554 nm, 560 nm und 595-610 nm erkennen, die den Cytochromen c, c₁, b und aa₃ zugeordnet werden können. Bei den Stämmen GDVO und UKB1 dagegen fehlen die Peaks der Cytochrome b und aa₃ bzw. sind zumindest sehr stark reduziert.

Der primäre Effekt des Ausfalls von Cbs1p führt zum Erliegen der Apocytochrom *b* Synthese (Rödel *et al.*, 1986). Sekundär wird aber in Stämmen, in denen das *COX1*-Gen das vierte Intron (*al4*) besitzt, auch kein funktionelles Cox1p gebildet, da das Spleißen dieses Introns von einer intronkodierten Maturase des *COB*-Genes (*bl4p*-Maturase) abhängig ist (De La Salle *et al.*, 1982). Somit entfällt in diesen Stämmen auch die Assemblierung und der Nachweis der proteingebundenen Häm *a*- und *a*₃-Gruppen der Cytochrom *c*-Oxidase. Die relative Peakhöhe der Cytochrome *c* und *c*₁ sind bei UKB1 und DBY747 vergleichbar, während bei GDV0 der Cytochrom *c*₁ Peak etwas geringer ausfällt. Unter Berücksichtigung der zahlreichen Überlagerungen und der limitierten Vergleichbarkeit von Ganzzell-Spektren lassen sich jedoch keine quantitativen Aussagen treffen. Die qualitative Interpretation der Befunde lässt keine signifikanten Unterschiede zwischen Disruption und Replacement des *CBS1*-Allels erkennen. Der $\Delta cbs1$ -vermittelte Phänotyp konnte eindeutig in beiden Stämmen belegt werden.

3.1.3 Betrachtungen zum „questionable“ ORF YDL068w

Wie einleitend zu diesem Kapitel erwähnt, liegt im 5'-Bereich des *CBS1*-ORF ein als „fragwürdig“ klassifizierter ORF auf dem Gegenstrang (Abb. 3). Bei der Analyse der Daten des Hefe-Genomsequenzierprojektes wird deutlich, dass der größte Anteil der Leserahmen überlappungsfrei auf beiden Strängen der DNA (w- und c-Strang) organisiert ist. Die mRNA überlappend transkribierter Leserahmen könnte zur gegenseitigen Beeinflussung der Genexpression durch Hybridbildung komplementärer RNA-Bereiche („antisense“-Effekt) führen.

Allerdings konnte für *CBS1* gezeigt werden, dass die Synthese von plasmidkodierter „antisense“-mRNA keinen Einfluss auf die Cbs1p Expression besitzt (Körte, 1989). Aufgrund der Disruption kann im GDV0 eine Expression des ORF nicht ausgeschlossen werden. Aus den vorangegangenen phänotypischen Analysen der *cbs1*-Nullmutanten kann geschlussfolgert werden, dass der ORF YDL068w - falls überhaupt - für kein essentielles Genprodukt kodiert.

Aufgrund der Beobachtung, dass sich beide Stämme hinsichtlich der untersuchten phänotypischen Parameter (s. 3.1.2) nicht unterscheiden, kann gesagt werden, dass das (theoretische) YDL068w Genprodukt offensichtlich nicht an der mitochondrialen Biogenese beteiligt ist und den *cbs1*-Phänotyp überlagert. Da keine experimentellen Daten zur Transkription des ORF im UKB1, GDV0 oder im Wildtyp vorliegen, können nur Hinweise aus den bioinformatischen Expressionsanalysen des Gesamtgenoms angeführt werden, die im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit detailliert vorgestellt werden.

3.2 Analysen zu Topologie, Lokalisation und Membranständigkeit von Cbs1p

3.2.1 Computergestützte Strukturanalyse des Cbs1-Proteins

3.2.1.1 Vorhersagen der Sekundärstruktur

Als Grundlage für die weiteren Arbeiten mit Cbs1p wurden computergestützte Analysen zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Cbs1p durchgeführt. Da sich die Ergebnisse verschiedener Programme zum Teil erheblich unterscheiden, wurde eine Methode gewählt, die einen Konsensus der Sekundärstruktur-Vorhersagen von 8 verschiedenen Programmen ermittelt. Zu diesen Voraussageprogrammen gehören „DPM“ (Deleage and Roux, 1987), „DSC“ (King and Sternberg, 1996), „GOR1“ (Garnier *et al.*, 1978), „GOR3“ (Gibrat *et al.*, 1987), „MLRC“ (Guermeur *et al.*, 1999), „PHD“ (Rost and Sander, 1993), „Predator“ (Frishman and Argos, 1996) und „SOPM“ (Geourjon and Deleage, 1994). In Abb. 5 sind die einzelnen vorhergesagten Strukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt, Coil) schematisch dargestellt. Vier größere α -helicale Bereiche mit mehr als 10 Aminosäuren fallen auf, wobei sich die Helix zwischen den As 4 und 18 in der abspaltbaren Präsequenz befindet. Die Prozessierungsstelle der mitochondrialen Matrixprotease liegt hingegen innerhalb einer β -Faltblattstruktur (Thr(29) ↓ Ile(30), (Körte *et al.*, 1989)). Weitere längere Helices werden von den As 94-113, 151-168 und 190-206 ausgebildet.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Cbs1p aufgrund der computergestützten Sekundärstruktur-Analysen keiner Proteinfamilie oder -gruppe zugeordnet werden kann. Aus den Vorhersagen lassen sich auch keine zuverlässigen Parallelen zu Strukturen bekannter Proteine ziehen. Computerprogramme, die auf der Basis von multiplen Alignments Vorhersagen zur Sekundärstruktur treffen, können aus diesem Grund nicht eingesetzt werden.

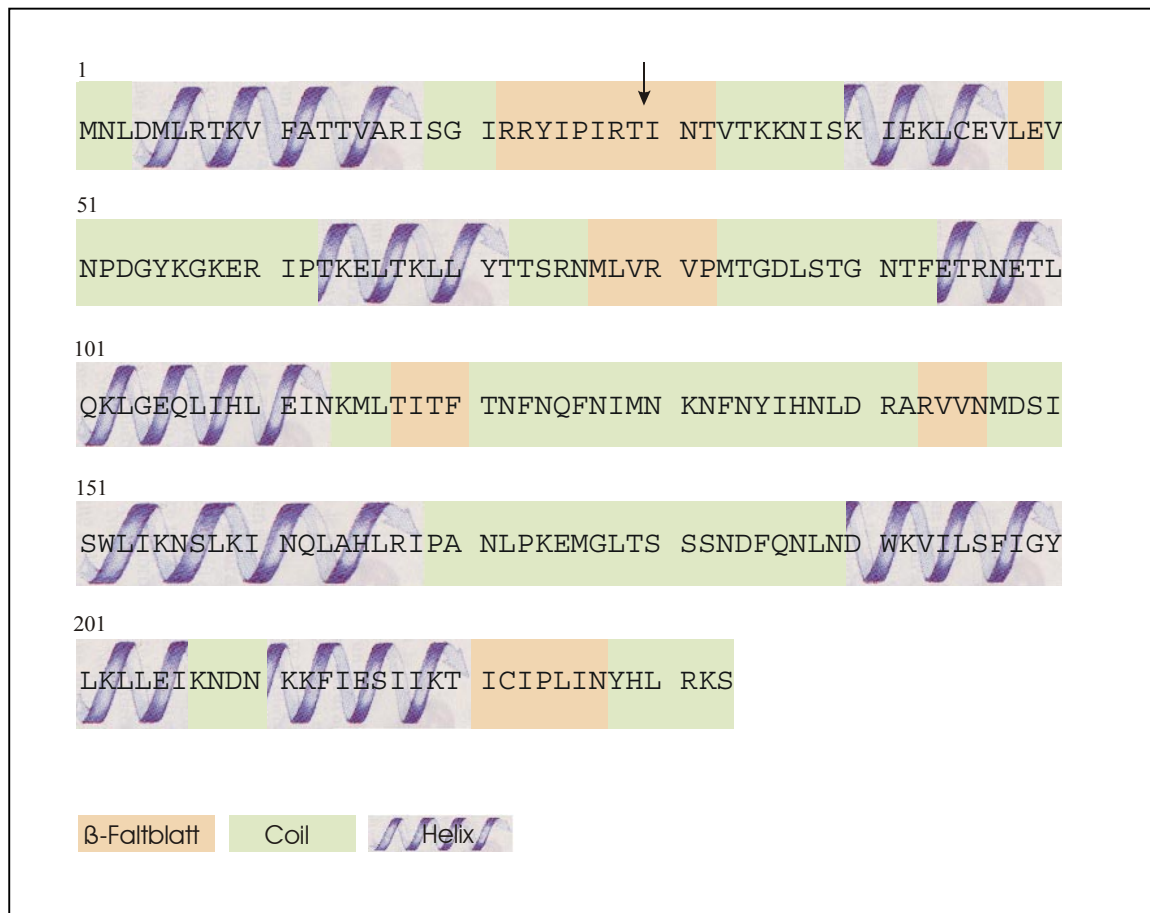


Abb. 5: Schematische Darstellung des Sekundärstruktur-Konsensus für Cbs1p aus den Ergebnissen verschiedener Computerprogramme

Die Spaltstelle der mitochondrialen Prozessing-Peptidase ist mit einem Pfeil markiert. Details s. Text.

3.2.1.2 Die Hydrophobizität von Cbs1p

In Experimenten zur Solubilisierung mit den Detergenzien Taurodeoxycholat bzw. n-Octyl-β-D-Glucopyranosid (Michaelis *et al.*, 1991) verhält sich Cbs1p wie Cyt1p, ein integrales Membranprotein, das über einen singulären hydrophoben Bereich in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist (Hase *et al.*, 1987). Computergestützte Analysen des physikochemischen Charakters von Cbs1p sollten Aufschluss darüber geben, welche potentiellen Bereiche für eine Membranassoziation verantwortlich sein könnten.

In Hydropathie-Plots von Cbs1p nach dem Kyte & Doolittle Algorithmus (Kyte and Doolittle, 1982) sind zwei hydrophobe Bereiche am C-Terminus auffällig (Abb. 6). Diese erstrecken sich zwischen den Aminosäuren 190 und 204 bzw. 215 und 228. Dabei wird, wie oben beschrieben, für den ersten hydrophoben Bereich die Ausbildung einer α -Helix vorausgesagt (s. Abb. 5).

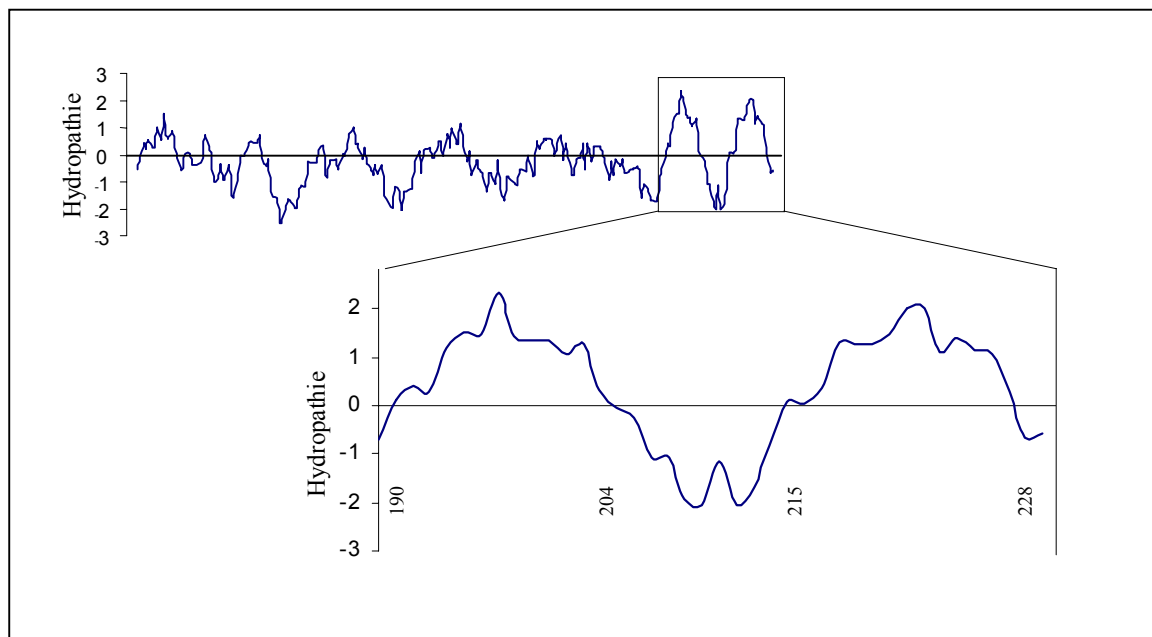


Abb. 6: Hydropathie-Plot von Cbs1p

Das Hydropathieprofil der As 1-233 (oberes Diagramm) und des C-terminalen Bereiches (As 190-233; unteres Diagramm) wurden nach dem Kyte & Doolittle Algorithmus erstellt. Negative Werte kennzeichnen hydrophile Bereiche.

Der zweite Bereich fällt nur partiell in eine Region, die sich möglicherweise helical faltet. Einige Voraussageprogramme für die Sekundärstruktur (s.o. „PHD“, „Predator“) postulieren allerdings auch für den gesamten zweiten hydrophoben Bereich im extremen C-terminalen Abschnitt eine Helixstruktur. Computerprogramme zur Voraussage von transmembranen Bereichen („DAS-Transmembrane Prediction server“ (Cserzo *et al.*, 1997), „PHDhtm“ (Rost *et al.*, 1995)) lokalisieren in den angegebenen C-terminalen Bereichen ebenfalls hydrophobe Segmente, die allerdings zu kurz sind, um als transmembraner Anker zu fungieren. Um die Lipiddoppelschicht einer Membran zu durchspannen, sind hydrophobe Helices von wenigstens 18 As Länge nötig (Lemmon *et al.*, 1997).

Da die beiden Segmente am C-Terminus die einzigen Cluster mit nennenswerter Hydrophobizität im Protein sind, wurden diese experimentell näher analysiert, um ihren Einfluss auf die Membranassoziation zu bestimmen.

3.2.2 Untersuchungen zur Membranassoziation

3.2.2.1 Molekularbiologische Untersuchungen

Um die Bedeutung des C-terminalen Bereiches für die Funktion von Cbs1p zu untersuchen, wurden die beiden hydrophoben Bereiche einzeln und gemeinsam deletiert und die Komplementationsfähigkeit der Mutantenproteine untersucht. Wenn die Funktion der hydrophoben Segmente ausschließlich in der Vermittlung der Membranständigkeit liegt, sollte deren Substitution durch heterologe bzw. artifizielle Membrananker zu einer Restauration des Atmungsdefekts der entsprechend transformierten Nullmutante führen. Zu diesem Zweck wurden die transmembranen Bereiche von CoxVap und Mrs2p ausgewählt bzw. eine artifizielle transmembrane Ankersequenz eingesetzt.

Die hydrophoben Bereiche am C-Terminus sind wichtig für die Funktion von Cbs1p

Die Deletion des proximal gelegenen hydrophoben Bereiches (As 193-204: Plasmid pRS415 Cbs1p Δ 193-204) wurde mittels „overlap-extension“-PCR (s. 2.2.2.10) unter Verwendung der Primerpaare #5/#7; #8/#9 bzw. #5/#9 eingeführt. Für die Konstruktion des Plasmides pRS415 Cbs1p Δ 215-228, das für ein Cbs1-Protein ohne den distalen hydrophoben Bereich (As 215 bis 228) kodiert, wurde das Plasmid-Insert mit den Primern #1 und #10 amplifiziert. Um beide Bereiche zu entfernen (As 193 bis 233) wurde die PCR mit den Primern #1 und #11 durchgeführt (pRS415 Cbs1p Δ 193-233). Die Plasmide mit den Mutantenallelen sowie das Wildtypallel-tragende Plasmid (pRS415 Cbs1p) wurden in die Nullmutante (UKB1) transformiert. Jeweils 10 Transformanten wurden auf Selektivmedium ausgestrichen und 2 d bei 30°C inkubiert.

Die Kolonieausstriche wurden auf jeweils 3 YPEG-Platten überstempelt, und nach einer 2tägigen Inkubation bei 23°C, 30°C bzw. 37°C erfolgte die Auswertung des Wachstums der Kolonien (Abb. 7).

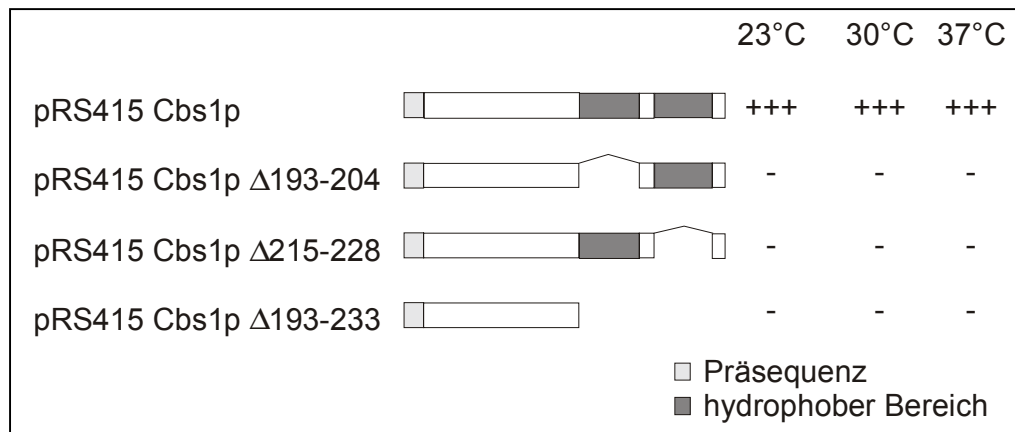


Abb. 7: Einfluss verschiedener Deletionen im C-terminalen Bereich von Cbs1p auf die Funktionalität

Die angegebenen Plasmide wurden in die *cbs1*-Nullmutante transformiert und die Transformanten auf YPEG-Medium bei drei Temperaturen inkubiert: „+++“ Wildtyp-entsprechendes, „-“ kein Wachstum. Die jeweiligen Proteine sind schematisch dargestellt.

Cbs1p-Mutantenproteine, denen der proximale (As 193-204) bzw. der distale (As 215-228) hydrophobe Bereich fehlt, sind nicht mehr in der Lage, die Nullmutante zu komplementieren. Erwartungsgemäß führt auch die Deletion beider Segmente zur Respirationsdefizienz. Offensichtlich sind die hydrophoben Cluster essentiell für die Funktion des Proteins.

Die hydrophoben Bereiche können nicht durch heterologe oder artifizielle Transmembrananker ersetzt werden

Um zu testen, ob nur die Hydrophobizität der Segmente *per se* von funktioneller Relevanz ist, wurden die deletierten Bereiche durch heterologe bzw. durch einen artifiziellen Transmembrananker substituiert. Die eingesetzten Transmembrananker sollten die Funktion der deletierten Cbs1p-Varianten wieder herstellen, falls die Funktion des C-terminalen Segmentes ausschließlich in der Membranverankerung oder der Bereitstellung hydrophober Momente liegt. Zu diesem Zweck wurden 3 verschiedene hydrophobe Peptide ausgewählt:



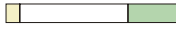







- (1) der Transmembrananker von CoxVap (As 93-118) (Miller and Cumsky, 1993),
- (2) die As 315 bis 362 von Mrs2p, die zwei benachbarte transmembrane Helices einschließen (Bui *et al.*, 1999),
- (3) ein artifizierter Membrananker (As-Sequenz: AAVAAAAVAWAAVAAA), wie er für *in vitro* Studien zur Membranverankerung von Proteinen verwendet wurde (Deber and Goto, 1997).

Der CoxVap-Anker befindet sich ebenfalls im C-terminalen Drittel des Proteins und wird durch positive Ladungcluster flankiert, die eine Rolle beim „stopp-transfer“-Import in die Mitochondrien spielen (Miller and Cumsky, 1993). Auch im Fall von Cbs1p werden die hydrophoben Bereiche durch Ladungcluster begrenzt. Da bei Cbs1p die hydrophoben Segmente durch einen hydrophilen Abschnitt getrennt voneinander vorliegen, wurde das transmembrane Helix-Tandem des Mrs2p eingesetzt, um diese Situation zu mimen. Beide heterologe Ankersequenzen gewährleisten zumindest bei ihren Herkunftspoteinen eine matrixseitige Orientierung des N-Terminus. Somit sollten auch die chimären Cbs1p-Konstrukte zum physiologischen Wirkort - der Matrix - orientiert sein. Transmembrane Ankersequenzen mitochondrialer Proteine können auch Targetsignale für den Insertionsort beinhalten, um eine effiziente Assemblierung zu sichern. Daher ist nicht auszuschließen, dass die chimären Proteine zwar topologisch korrekt in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert werden, aber möglicherweise räumlich getrennt von ihrem Funktionsort. Um diese Interferenz zu minimieren, wurde des weiteren ein artifizielles Transmembransegment verwendet.

Für die Fusion des CoxVap- und des Mrs2p-Ankers (Cox-TM bzw. Mrs-TM) an das C-terminal um 18 bzw. 42 As verkürzte Cbs1p (Cbs1p Δ (215-233) bzw. Cbs1p Δ (191-233)) wurden die entsprechenden Bereiche mittels PCR amplifiziert. Über die Primer für Cox-TM (#41 und #42) und Mrs-TM (#43 und #44) wurden artifizelle Schnittstellen für *Bam*HI bzw. *Xba*I eingefügt. Die PCR-Produkte und die Plasmide pRS415 Cbs1p Δ (215-233) bzw. pRS415 Cbs1p Δ (191-233) wurden *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und in entsprechenden Kombinationen ligiert, um die Plasmide pRS415 Cbs1p191::CoxTM, pRS415 Cbs1p215::CoxTM, pRS415 Cbs1p191::MrsTM bzw. pRS415 Cbs1p215::MrsTM zu erhalten. Zusätzlich wurden an alle chimären Konstrukte die As 222-233 des Cbs1p fusioniert, um den authentischen C-Terminus

wieder herzustellen. Die Vorgehensweise für die Klonierung unterscheidet sich von der oben beschriebenen nur durch den Ersatz der „reverse“-Primer #42 durch #45 für Cox-TM bzw. #44 durch #46 für die Amplifikation von Mrs-TM. Die erhaltenen Plasmide wurden pRS415 Cbs1p191::CoxTM-CIP, pRS415 Cbs1p215::CoxTM-CIP, pRS415 Cbs1p191::MrsTM-CIP bzw. pRS415 Cbs1p215::MrsTM-CIP bezeichnet.

Alle Plasmide wurden in die *cbs1*-Nullmutante UKB1 transformiert und die Transformanten auf ihre Komplementationsfähigkeit auf nicht-vergärbarem Medium getestet. Keines der beschriebenen Konstrukte war in der Lage, die *cbs1*-Nullmutante zu komplementieren und ein Wachstum auf Glycerinmedium zu ermöglichen (Abb. 8).

		23°C	30°C	37°C
pRS415 Cbs1p		+++	+++	+++
pRS415 Cbs1p 215::CoxTM		-	-	-
pRS415 Cbs1p 191::CoxTM		-	-	-
pRS415 Cbs1p 215::CoxTM-CIP		-	-	-
pRS415 Cbs1p 191::CoxTM-CIP		-	-	-
pRS415 Cbs1p 215::MrsTM		-	-	-
pRS415 Cbs1p 191::MrsTM		-	-	-
pRS415 Cbs1p 215::MrsTM-CIP		-	-	-
pRS415 Cbs1p 191::MrsTM-CIP		-	-	-
pRS415 Cbs1p 193-artTM-204		-	-	-







	Präsequenz
	hydrophobe Bereiche von Cbs1p
	C-Terminus von Cbs1p As 222-233
	CoxVap-Transmembrananker
	Mrs2p-Transmembrananker
	artificialer Transmembrananker

Abb. 8: **Komplementationsverhalten der durch Substitution der hydrophoben Bereiche von Cbs1p kreierte Proteinchimären**

Zellen des mit den angegebenen Plasmiden transformierten Stammes UKB1 wurden auf YPEG-Medium überstempelt und bei 23°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert. Die plasmidkodierte Proteine sind schematisch unter Angabe des eingesetzten Transmembranankers dargestellt: „+++“ Wildtyp-entsprechendes, „-“ kein Wachstum.

Durch die Fusionen kann die Stabilität und/oder die Faltung des Gesamtproteins beeinflusst sein, so dass nur noch ein Bruchteil der Aktivität des wt-Proteins vorhanden ist, die nicht mehr hinreichend ist, die Nullmutante zu komplementieren. Aus diesem Grund wurden alle Konstrukte in den multi-copy Vektor pRS425 umklont, um durch die Überexpression der Proteinchimären den Aktivitätsverlust zu kompensieren.

Interessanterweise zeigten nur die UKB1-Transformanden, die das Plasmid pRS425 Cbs1p215::CoxTM-CIP trugen, ein stark reduziertes Wachstum auf YPEG-Medium bei 30°C (Daten nicht gezeigt). Alle anderen Proteinchimären konnten das Cbs1p auch durch Überexpression funktionell nicht ersetzen. Wird allerdings das Cbs1p-Konstrukt Cbs1p215::CoxTM-CIP ohne artifiziellen Membrananker (Cbs1p215-CIP) überexprimiert, so kann ebenfalls ein stark reduziertes Wachstum der transformierten Nullmutante auf nicht-vergärbarem Medium bei 30°C beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Denkbar wäre, dass bei der Substitution des distalen hydrophoben Bereiches der transmembrane Bereich von CoxVap im Gegensatz zu dem von Mrs2p als „spacer“ akzeptiert wird.

Der artifizielle Membrananker wurde zwischen die As 193 und 204 mittels „overlap-extension“-PCR unter Verwendung der Primer #5 und #47 bzw. #48 und #9 für den ersten Schritt sowie #5 und #9 für die finale Reaktion inseriert. Das resultierende Plasmid pRS415 Cbs1p193-artTM-204 enthält das PCR-Produkt als *XbaI/BamHI*-Insert. Auch dieses Konstrukt war sowohl im single- (Abb. 8) als auch multi-copy Vektor nicht in der Lage, die Nullmutante UKB1 nach der Transformation zu komplementieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein hydrophober Charakter des C-terminalen Bereiches *per se* nicht hinreichend für die Funktionalität des Proteins ist. Falls eine Insertion der chimären Proteine in die Membran entsprechend der Voraussagen vorliegt, so dient der authentische Cbs1p C-Terminus offensichtlich nicht oder nicht ausschließlich der Membranassoziation.

3.2.2.2 Biochemische Analysen der Membranassoziation

Um die aus den molekularbiologischen Untersuchungen zur Hydrophobizität des C-Terminus resultierenden Vorhersagen experimentell zu belegen, wurde die Membranassoziation von Cbs1p und Cbs1p-Derivaten biochemisch charakterisiert. Dabei wurden Mitochondrien in Gegenwart verschiedener Puffer, die in steigendem Maße in der Lage sind, peripher assoziierte Proteine von der Membran zu lösen, lysiert und durch Ultrazentrifugation in eine lösliche und mit den Membranen co-sedimentierende unlösliche Fraktion getrennt. Außerdem war es für diese Fragestellung notwendig, ein geeignetes immunologisches Nachweissystem zu etablieren.

3.2.2.2.1 Immunologischer Nachweis von Cbs1p

Da keine Cbs1p-spezifischen Antikörper verfügbar waren, wurden Fusionen mit geeigneten Antigenen, für die es kommerziell verfügbare Antikörper gibt, durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Epitope C-terminal an Cbs1p fusioniert und ihre Eignung sowohl in Hinblick auf die Komplementationsfähigkeit im Vergleich zum Wildtypallel als auch auf einen eindeutigen immunologischen Nachweis getestet. Folgende Epitop-tags wurden C-terminal fusioniert:

- (1) 6fache Wiederholung der As Histidin (His₆-tag),
- (2) AU5-tag (As-Sequenz: TDFYLK),
- (3) HA-tag in einfacher Kopie (As-Sequenz: CYPYDVPDYA) und
- (4) HA-tag in 3facher Tandemwiederholung.

Der Einsatz des His₆-tag erlaubt den Nachweis sowohl mittels spezifischer Antikörper, die die Histidin-Wiederholungen und meist ein oder zwei benachbarte Aminosäuren der „multiple cloning site“ erkennen, als auch durch Ni-NTA-konjugierte Enzyme (Peroxidase, Phosphatase). In diesem Fall wird der konjugierte Komplex über das Nickel-Ion an das Histidin-Cluster gebunden. Mit einem His₆-tag versehene Proteine lassen sich auch durch die Verwendung von Ni-NTA-Säulen vergleichsweise einfach aufreinigen. Nachteilig ist allerdings die starke positive

Eigenladung des Epitops, die möglicherweise mit der Funktionalität des Proteins interferiert.

Interessanterweise bewirkt die zusätzliche Einführung von 6 positiven Ladungen am C-Terminus von Cbs1p keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der transformierten Nullmutante auf nicht-vergärbarem Medium. Da der extreme Cbs1p C-Terminus ohnehin positiv geladen ist, können weitere positive Ladungen vielleicht besser toleriert werden. Im immunologischen Nachweis erwies sich der His₆-tag jedoch als ungeeignet, da eine Vielzahl kreuzreagierender Proteine eine eindeutige Detektion verhindert (Daten nicht gezeigt). Dieser „tag“ ist in Hefe möglicherweise generell nur bedingt einsetzbar, da mehrere authentische Proteine über ein His-Cluster identischer oder leicht verkürzter Ausdehnung verfügen, wie aus einem Homologie-Suchergebnis innerhalb der Hefe-Protein-Datenbank deutlich wird.

Der AU5-tag leitet sich von einem Capsidprotein des Rinder-Papillomavirus (BPV-1) ab (Lim *et al.*, 1990) und interferiert nach C-terminaler Fusion ebenfalls nicht mit der Funktion des Cbs1p. In der Western-Analyse von Mitochondrienlysaten, die entweder ein AU5-tag-tragendes oder -freies Cbs1p enthalten, wird jeweils ein starkes Signal bei ca. 30 kDa detektiert (Daten nicht gezeigt). Da diese kreuzreagierende Bande im Größenbereich der nachzuweisenden Konstrukte liegt, wurde auch dieses Epitop nicht verwendet.

Auch das C-terminale Cbs1-Fusionsprotein mit dem 9 As umfassenden Epitop aus dem Hämagglutinin (HA-Epitop) komplementiert die *cbs1*-Nullmutante vergleichbar dem Wildtypprotein. Die schwache Expression von Cbs1p und eine Anzahl kreuzreagierender Banden im erwarteten Molekulargewichtsbereich erschweren jedoch auch hier eine eindeutige Zuordnung (Daten nicht gezeigt). Da sich das HA-Fusionsprotein prinzipiell nachweisen lässt, wurde versucht, die Spezifität des Nachweises durch eine 3fache Tandemanordnung des HA-Epitops (3HA-tag) zu erhöhen. Dazu wurde das mit den Primern #31 und #32 amplifizierte PCR-Produkt über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Sma*I und *Sa*II in den Vektor YEp351::3HA kloniert, um das Plasmid YEp351 Cbs1p::3HA zu erhalten. Um unter authentischen Expressionsbedingungen zu arbeiten, wurde das Plasmid zunächst mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I geschnitten und „blunt“-Enden geschaffen (s. 2.2.2.3.4). Mit *Hind*III wurde das Fragment mit dem tag-tragenden *CBS1*-Gen

inklusive Promotorbereich herausgeschnitten und in den single-copy Vektor pRS415 umklont. Das resultierende Plasmid pRS415 Cbs1p::3HA und das Plasmid pRS415 Cbs1p wurden in die Nullmutante UKB1 transformiert und das Wachstum der Transformanten auf nicht-vergärbarem Medium verglichen. Da keine negative Beeinflussung des Wachstums durch das fusionierte 3HA-tag festgestellt werden konnte, wurden von diesen Transformanten Mitochondrien präpariert und die mitochondrialen Proteine im PAA-Gel aufgetrennt (s. 2.2.3.7). Auf dem Western Blot (Abb. 9) kann bei allen Proben, die Cbs1p mit dem 3HA-tag exprimieren, eine spezifische Bande (a) mit einem Molekulargewicht von ca. 29000 nachgewiesen werden (Spuren 1 bis 4). Das theoretische Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 31900 als Precursor bzw. 28600 als reifes Protein und liegt in guter Übereinstimmung mit dem experimentell gefundenen Wert. Dieses Signal fehlt in Mitochondrien aus untransformierten Wildtypzellen (Spur 7) oder der Nullmutante UKB1, die das Plasmid pRS415 Cbs1p enthält (Spur 5).

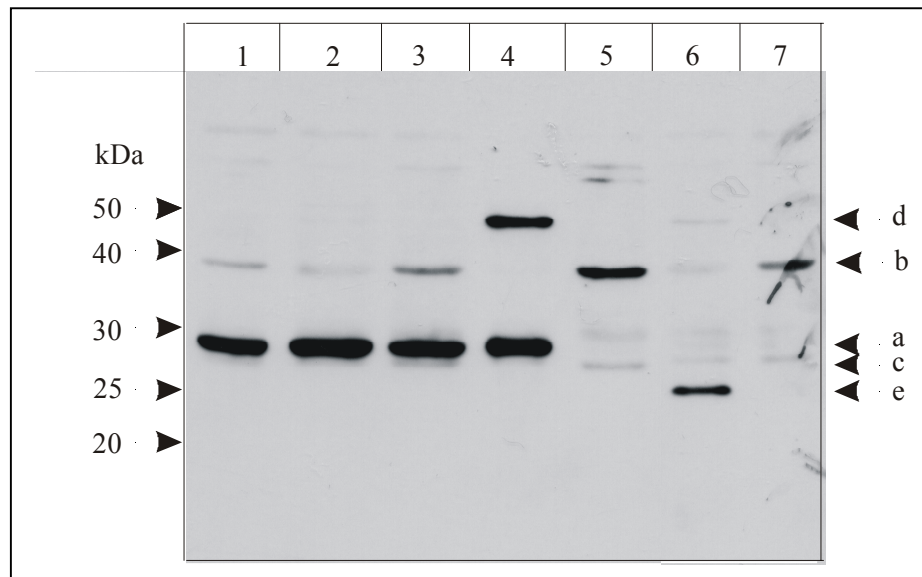


Abb. 9: Immunologischer Nachweis des Cbs1p-HA-Fusionsproteins

Jeweils 60 µg mitochondriales Protein wurden auf ein 15 %iges PAA-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Anti-HA Antikörpern. (a) Nachweis von Cbs1p-HA in Mitochondrien des $\Delta cbs1$ -Stammes UKB1 unter authentischer Expression (Spuren 1, 4; authentischer Promotor, single-copy Vektor) und Überexpression (Spuren 2, 3; authentischer Promotor, multi-copy Vektor). Die entsprechende Bande fehlt im Wildtypstamm DBY747 (Spur 7) und im $\Delta cbs1$ -Stamm UKB1, der mit einem Plasmid transformiert wurde, das Cbs1p ohne HA-tag authentisch exprimiert (Spur 5). (b, c) Kreuzreagierende Proteine, die bei Wachstum auf lactat- (Spuren 1, 3, 5, 7) oder raffinosehaltigen (Spuren 2, 6) Medien exprimiert werden. (d) Abundantes Glucose-induziertes cytoplasmatisches Protein, das als Kontamination der mitochondrialen Präparation mit dem HA-Antikörper kreuzreagiert (Spur 4). (e) Die Detektion einer niedermolekularen Bande bei Expression eines C-terminal verkürzten Cbs1p (Cbs1p $\Delta(193-233)$) mit HA-tag (Spur 6) verdeutlicht die Spezifität des Nachweises.

3.2.2.2.2 Löslichkeitsverhalten von Cbs1p

Periphere Membranproteine können durch den Einsatz von hoher Ionenstärke oder extremem pH-Wert leicht von der Membran abgelöst werden, wobei die Membran intakt bleibt. Die Solubilisierung integraler Membranproteine verlangt hingegen die Zerstörung der Membran durch Detergenzien (Verner and Beers, 1995).

Das Kriterium der unterschiedlichen Solubilisierungseigenschaften von Membranproteinen wurde verwendet, um die Art der Membranassoziation von Cbs1p näher zu charakterisieren.

Dazu wurden Mitochondrien aus Zellen isoliert, die Cbs1p::3HA exprimieren, und in 10 mM Tris/HCl-Puffer mit oder ohne Zusatz von 1 M NaCl aufgenommen und zusätzlich mit Ultraschall aufgeschlossen. Ein weiteres Aliquot der Mitochondrien wurde für die alkalische Extraktion mit 0,1 M Na₂CO₃ eingesetzt. Die Fraktionierung in lösliche und unlösliche Proteine erfolgte mittels Ultrazentrifugation (s. 2.2.3.3).

Lösliche Proteine der mitochondrialen Matrix verbleiben bereits beim Aufschluss der Mitochondrien mit 10 mM Tris/HCl und Ultraschall im Überstand. Integrale Membranproteine, membranverankerte Proteine (Lipidanker) und periphere Proteine, die durch elektrostatische Wechselwirkung oder durch nichtkovalente Bindung an andere Membranproteine mit der Membran assoziiert sind, werden dagegen sedimentiert.

Durch Erhöhung der Salzkonzentration können nicht-kovalent an der Membran haftende Proteine solubilisiert werden. Bei einer NaCl-Konzentration über 0,6 M werden Protein-Protein-Interaktionen, die auf ionischen Wechselwirkungen beruhen, zunehmend aufgehoben (Penefsky and Tzagoloff, 1971; Rosenberg, 1996). Integrale Membranproteine, also solche, die über mindestens einen Transmembrananker oder über einen kovalent gebundenen Lipidanker verfügen, verhalten sich resistent gegenüber einer alkalischen Extraktion (Fujiki *et al.*, 1982; Penefsky and Tzagoloff, 1971). Zur Kontrolle der Fraktionierung wurden die Blots nach dem „stripping“ mit Antikörpern gegen das integrale Innenmembranprotein Sco1p (Buchwald *et al.*, 1991) bzw. das peripher membranassoziierte Cit1p (Haggie and Brindle, 1999) immundekoriert.

Cbs1p ist ein peripher assoziiertes Membranprotein

Cbs1p lässt sich nahezu quantitativ bei stark alkalischem pH-Wert (0,1 M Na₂CO₃, pH 11,5) von der Membran lösen und verhält sich damit vergleichbar zu Cit1p (Abb. 10). Im Gegensatz dazu co-sedimentiert Sco1p mit der Membran-Fraktion. Da periphere Membranproteine durch hohe pH-Werte solubilisiert werden können (Penefsky and Tzagoloff, 1971), ist auch Cbs1p in diese Klasse der Membranproteine einzuordnen. Diese Aussage wird auch durch das Löslichkeitsverhalten unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) unterstützt, wo Cbs1p in beiden Fraktionen nachgewiesen werden kann.

Hohe Salzkonzentrationen schwächen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. Proteinen und den geladenen Lipidanteilen ab (Rosenberg, 1996) und führen zur Solubilisierung der assoziierten Membranproteine. Während unter diesen Bedingungen ca. 60 % der Citratsynthase in Lösung gehen - vergleichbar mit Cbs1p - verbleibt Sco1p in der Membran (Abb. 10).

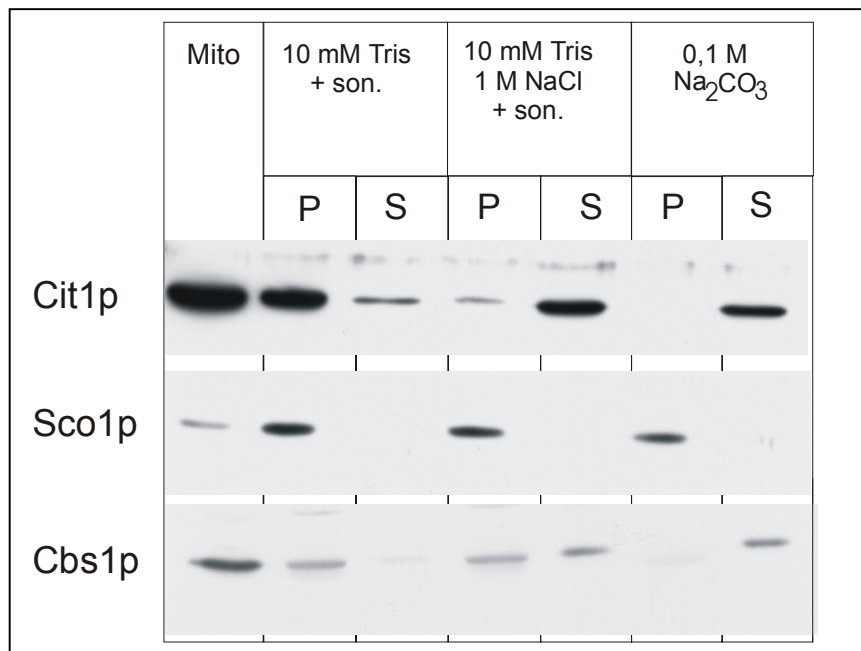


Abb. 10: **Löslichkeitsverhalten von Cbs1p**

Aus dem Cbs1p-3HA exprimierenden (authentischer Promotor, single-copy Vektor) $\Delta cbs1$ -Stamm UKB1 wurden nach aerobem Wachstum auf Raffinose Mitochondrien (Mito) isoliert. Je 300 μ g mitochondriales Protein wurden mit den angegebenen Pufferlösungen inkubiert und durch Ultrazentrifugation in eine lösliche (S) und mit der Membran co-sedimentierende (P) Fraktion getrennt. Zur Kontrolle der Fraktionierung wurden Antikörper gegen die Citratsynthase (Cit1p) bzw. gegen das Membranprotein Sco1p eingesetzt.

Das Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen hat keinen Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten

Für eine Reihe von Membranproteinen konnte gezeigt werden, dass sich ihr Löslichkeitsverhalten in Abhängigkeit von der zur Kultivierung der Zellen verwendeten Kohlenstoffquelle verändert. Beispielsweise konnte für eine Reihe von Ectoproteinen der Hefe eine Glucose-induzierte Umwandlung von amphiphiler zu

hydrophiler Form nachgewiesen werden (Bandlow *et al.*, 1995). Für ein cAMP-bindendes mitochondriales Protein der Hefe konnte ebenfalls eine amphitropische Natur nachgewiesen werden (Müller and Bandlow, 1989c). Um den Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Löslichkeitsverhalten von Cbs1p zu untersuchen, wurden Zellen, die das HA-tag tragende Cbs1p exprimieren, in lactat-, glucose- oder raffinosehaltigen Medien angezogen und die Lysate der isolierten Mitochondrien der bereits beschriebenen Fraktionierung unterzogen (Abb. 11).

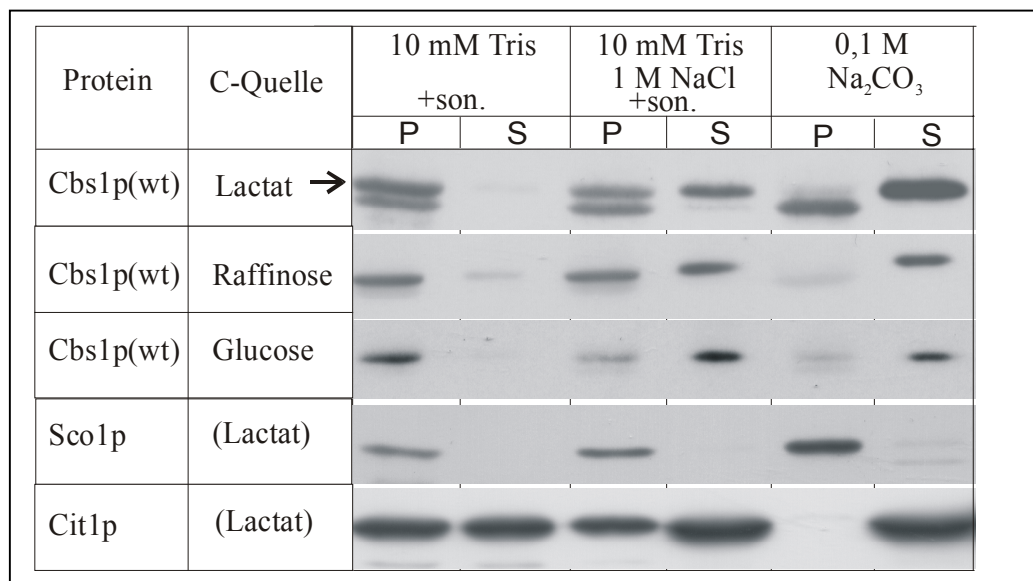


Abb. 11: **Einfluss der Kohlenstoffquelle auf das Löslichkeitsverhalten von Cbs1p**

Zellen der mit pRS415 Cbs1p::3HA transformierten Nullmutante UKB1 wurden auf Medien mit Glucose, Raffinose bzw. Lactat propagiert und die Mitochondrien (Mito) isoliert. Die Fraktionierung in lösliche bzw. mit der Membran co-sedimentierende Proteine erfolgte wie beschrieben (s. 2.2.3.3). Die Proteine wurden quantitativ auf ein PAA-Gel geladen und eine Western-Analyse mit Antikörpern gegen das HA-Epitop bzw. gegen Sco1p und Cit1p durchgeführt. Bei Lactat-gewachsenen Zellen tritt die bereits charakterisierte (s. 3.2.2.2.1) stark kreuzreagierende Bande hervor. Die Cbs1p::3HA-spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Unabhängig von der Kohlenstoffquelle wird Cbs1p bei Behandlung der Membranen mit 0,1 M Na₂CO₃ fast vollständig solubilisiert. Unter Hochsalzbedingungen ist der Anteil des löslichen Cbs1p bei Verwendung von Glucose vergleichsweise etwas höher.

Derartig geringe Verhältnisunterschiede liegen aber wohl eher in der präparativen Methode begründet. Bei den in der Literatur beschriebenen Löslichkeitskonversionen liegt die Ursache in der Abspaltung eines Lipidankers. Dieser molekulare Mechanismus sollte zu einer drastischen Veränderung der alkalischen Extrahierbarkeit führen. Die Löslichkeit von Cbs1p wird offensichtlich nicht durch die Wahl der Kohlenstoffquelle beeinflusst.

3.2.2.2.3 Einfluss der hydrophoben Bereiche auf das Löslichkeitsverhalten von Cbs1p

Wie oben beschrieben (s. 3.2.1), verfügt Cbs1p nur im C-terminalen Bereich über eine nennenswerte Hydrophobizität. Mit den folgenden Experimenten soll der Einfluss dieser hydrophoben Cluster auf die Extrahierbarkeit unter Hochsalzbedingungen und hohem alkalischen pH-Wert untersucht werden.

Dazu wurden HA-Fusionen mit den C-terminal deletierten Cbs1p-Derivaten, wie für Cbs1p::3HA beschrieben (s. 3.2.2.2.1), unter Verwendung der Plasmide pRS415 Cbs1p Δ (193-204) bzw. pRS415 Cbs1p Δ (215-228) als Template für die PCR hergestellt. Die UKB1-Transformanden, die jeweils das entsprechende Plasmid (pRS415 Cbs1p::3HA; pRS415 Cbs1p Δ (193-204)::3HA bzw. pRS415 Cbs1p Δ (215-228)::3HA) tragen, wurden in Raffinosemedium propagiert und die Mitochondrien isoliert. Die Fraktionierung zur Bestimmung der Löslichkeit erfolgte nach dem bereits erläuterten Protokoll (s. 2.2.3.3) (Abb. 12).

Die Entfernung der C-terminalen hydrophoben Segmente beeinflusst die Löslichkeit

Die C-terminal deletierten Proteine zeigen eine unerwartete Veränderung des Löslichkeitsverhaltens. Entgegen den Erwartungen sedimentiert selbst bei der alkalischen Extraktion der überwiegende Anteil mit der Membran-Fraktion. Die Löslichkeit der Kontrollproteine (Sco1p, Cit1p) bleibt erwartungsgemäß unverändert. Subtile Unterschiede lassen sich auch beim Vergleich der löslichen Fraktionen der Deletionsmutanten nach Hochsalzbehandlung feststellen. Die Entfernung des distalen hydrophoben Bereiches (As 215-228) führt zu einem etwas erhöhten Anteil

an löslicher Form. Möglicherweise vermittelt der verbleibende hydrophobe Bereich eine festere Assoziation mit der Membran.

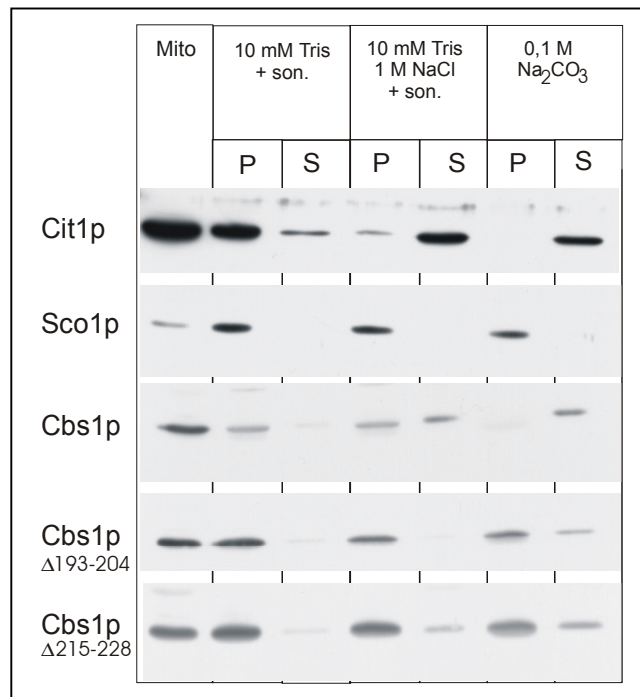


Abb. 12: Löslichkeitsverhalten von Cbs1p-Derivaten mit C-terminalen Deletionen

Mitochondrien (Mito) von Cbs1p::3HA, Cbs1p $\Delta(193-204)$::3HA bzw. Cbs1p $\Delta(215-228)$::3HA exprimierenden Zellen wurden isoliert und die Proteine nach dem oben beschriebenen Protokoll fraktioniert. Die Proben wurden quantitativ aufgetragen und einer Western-Analyse unterzogen.

Die besondere Form der Membranassoziation der Deletionsmutanten beruht nicht auf der Präsenz eines Lipidankers

Die veränderte Membranassoziation könnte auf einen Lipidanker zurückgeführt werden, wenn dessen kovalente Verknüpfung mit dem Protein direkt oder indirekt durch die Manipulationen am C-Terminus beeinflusst wird. Um diese Hypothese zu testen, wurden Mitochondrien aus Zellen, die das Konstrukt Cbs1p $\Delta(193-204)$::3HA exprimieren, isoliert, lysiert und nach der Methode von Müller und Bandlow (1989b), behandelt. Die Lysate wurden dabei mit unterschiedlichen Phospholipasen (PL) unter optimalen Reaktionsbedingungen inkubiert (s. 2.2.3.5). Lipidanker, die aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und

Phosphatidylserin aufgebaut sind, können von den Phospholipasen A₂, C und D hydrolysiert werden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Lipasen in der Art der Hydrolyse (β -Esterbindung oder Phosphatbindung) und der Substratpräferenz. Die nachfolgende Verteilung des Proteins nach Fraktionierung im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Enzym sollte Hinweise über die Anwesenheit eines Lipidankers geben (Abb. 13).

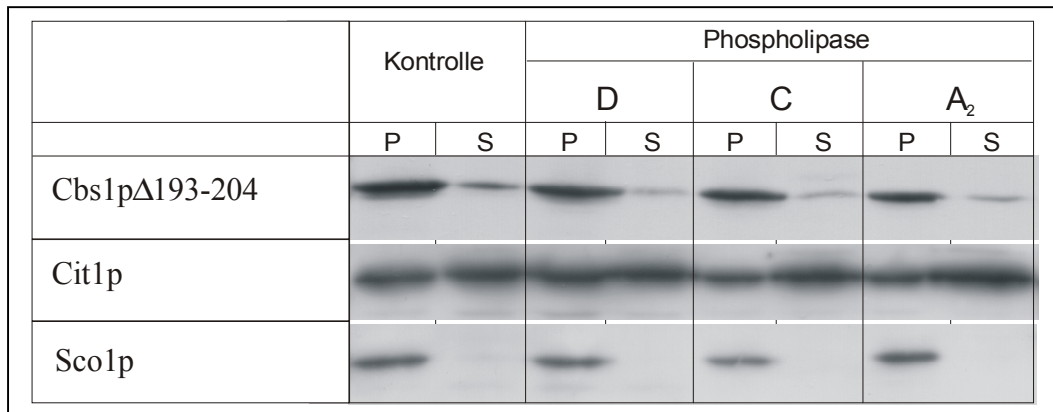


Abb. 13: Löslichkeitsverhalten von Cbs1p (Δ 193-204)::HA nach Behandlung mit Phospholipasen

Je 300 μ g mitochondriales Protein des Cbs1p Δ (193-204)::3HA exprimierenden (authentischer Promotor, single-copy Vektor) Δ *cbs1* Stammes UKB1 wurden ohne (Kontrolle) und mit den Phospholipasen A₂, C bzw. D inkubiert (s. 2.2.3.5). Nach Inkubation bei 30°C für 30 min erfolgte die Fraktionierung in lösliche und unlösliche Proteine durch Ultrazentrifugation bei 220000xg, 1h. Die TCA-gefällten Fraktionen wurden quantitativ auf ein 15 %iges PAA-Gel aufgetragen und einer Western-Analyse mit Antikörpern gegen HA (oben), Cit1p (Mitte) und Sco1p (unten) unterzogen.

Das identische Verteilungsverhältnis des Cbs1p Δ (193-204)::3HA zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion in den Proben mit und ohne Zusatz der Phospholipasen gibt keinerlei Hinweise auf die Beteiligung eines Lipidankers an der Membranassoziation.

3.2.2.2.4 Löslichkeitsverhalten von Cbs1p in Mitochondrien eines *rho*⁰-Stammes

In Mitochondrien ohne mtDNA (*rho*⁰) fehlen essentielle Untereinheiten der Atmungskomplexe, die vom mt-Genom kodiert werden. Die kernkodierten Untereinheiten der Komplexe können unter diesen Bedingungen nicht korrekt

assembliert werden und werden proteolytisch abgebaut (Grivell *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Membranassoziation von Cbs1p in *rho*⁰-Mitochondrien sollte Aussagen darüber zulassen, ob mitochondrial kodierte Proteine für die beobachtete Membranassoziation von Bedeutung sind.

Um das Löslichkeitsverhalten von Cbs1p in *rho*⁰-Mitochondrien zu untersuchen, wurden die single-copy Plasmide pRS415 Cbs1p::3HA; pRS415 Cbs1p Δ (193-204)::3HA und pRS415 Cbs1p Δ (215-228)::3HA bzw. die multi-copy Plasmide YEp351 Cbs1p::3HA; YEp351 Cbs1p Δ (193-204)::3HA und YEp351 Cbs1p Δ (215-228)::3HA in den Stamm DBY747 [*rho*⁰] transformiert. Die Mitochondrien wurden isoliert (s. 2.2.3.1.2) und die Lysate einer Western-Analyse unterzogen (Abb. 14).

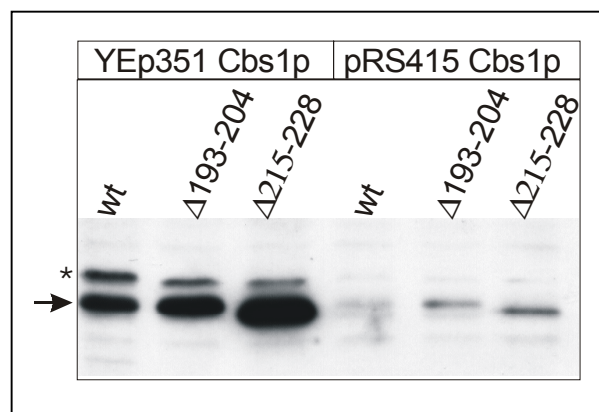


Abb. 14: Nachweis von Cbs1p (wt) bzw. C-terminal verkürzten Derivaten in *rho*⁰-Mitochondrien

Die HA-tag tragenden Proteine wurden authentisch exprimiert (single-copy Vektor pRS415) bzw. überexprimiert (multi-copy Vektor YEp351). Je 125 μ g mitochondriales Protein wurden aufgetragen. Die Cbs1p-korrespondierenden Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die auf Höhe des Sterns liegenden Banden repräsentieren möglicherweise die jeweilige nicht-prozessierte Cbs1p-Precursorform.

Interessanterweise lässt sich Cbs1p (wt) in *rho*⁰-Mitochondrien - im Vergleich zu *rho*⁺-Mitochondrien (s. Abb. 9) - kaum nachweisen. Möglicherweise ist das Protein in *rho*⁰-Mitochondrien instabil und wird vermehrt proteolytisch abgebaut. Die Cbs1p-Derivate mit den C-terminalen Deletionen können hingegen deutlich nachgewiesen werden, was auf eine höhere Stabilität deuten könnte. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Nachweisbarkeit von Cbs1p durch Überexpression (multi-copy, YEp351) zu verbessern.

In diesem Fall lässt sich das wt Cbs1p problemlos nachweisen, wenngleich die Konzentration der C-terminal trunkierten Proteine wiederum höher ist (Abb. 14). Bemerkenswert ist die Akkumulation einer höhermolekularen Bande, die möglicherweise den nicht-prozessierten, Mitochondrien-assoziierten Precursor von Cbs1p darstellt.

Da sich in ρ^+ -Mitochondrien das Löslichkeitsverhalten von überexprimiertem Cbs1p nicht von dem unter authentischer Expression unterscheidet (s. Abb. 10 und Abb. 15), wurde das Protein für die weiteren Analysen von Cbs1p im ρ^0 -Hintergrund überexprimiert.

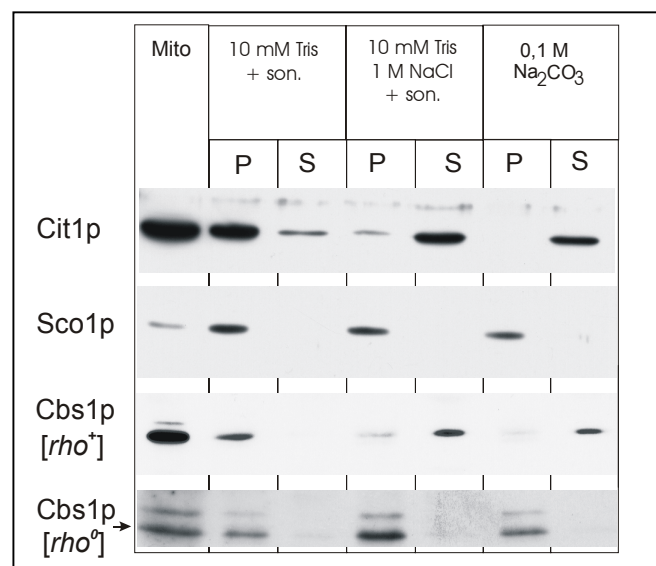


Abb. 15: Löslichkeit von Cbs1p in ρ^0 - im Vergleich zu ρ^+ -Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden aus ρ^+ - und ρ^0 -Zellen isoliert, die Cbs1p überexprimierten (multi-copy), wie unter 2.2.3.3 beschrieben, nach Behandlung mit Puffern verschiedener Salzkonzentration bzw. 0,1 M Na₂CO₃ in eine lösliche (S) bzw. mit den Membranen co-sedimentierende (P) Fraktion durch Ultrazentrifugation separiert. Als Referenz wurden das Matrixprotein Cit1p und das integrale Protein der inneren Mitochondrienmembran Sco1p in ρ^0 -Mitochondrien nachgewiesen.

Cbs1p aus ρ^0 -Mitochondrien kann nicht durch 1 M NaCl solubilisiert werden und verhält sich resistent gegenüber der alkalischen Extraktion

Während sich Cbs1p in ρ^+ -Mitochondrien teilweise durch 1 M NaCl solubilisieren lässt, co-sedimentiert das Protein in Lysaten aus ρ^0 -Mitochondrien überraschenderweise nahezu vollständig mit der Membran-Fraktion (Abb. 15).

Selbst durch die alkalische Extraktion kann das Protein aus ρ^0 -Mitochondrien im Gegensatz zur Situation im ρ^+ -Hintergrund nicht in die lösliche Fraktion überführt werden. Offensichtlich verändert sich die Art der Membranassoziation von Cbs1p in ρ^0 -Mitochondrien. Dieses Phänomen ist möglicherweise durch die dramatischen Veränderungen der Proteinstrukturen der Atmungskettenkomplexe bedingt.

Die Resistenz des wt-Proteins in ρ^0 -Mitochondrien gegenüber der alkalischen Extraktion erinnert auch an das Löslichkeitsverhalten der C-terminalen Deletionsmutanten (s. 3.2.2.2.3, Abb. 12). Dieses wird jedoch nicht durch den ρ^0 -Status der Mitochondrien beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass sowohl in den ρ^0 -Mitochondrien (durch den fehlenden Interaktionspartner) als auch bei den C-terminalen Deletionen (durch die Entfernung einer potentiellen Protein-Interaktionsstelle) essentielle Protein-Protein-Interaktionen nicht aufrecht erhalten werden können. Als Folge inkorrekt/fehlender Assemblierung könnte Cbs1p in Carbonat-resistenten Aggregaten oder Strukturen akkumulieren. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der Carbonat-lösliche Anteil von Cbs1p, der offensichtlich auch die physiologisch aktive Form repräsentiert, durch proteolytischen Abbau (s. oben) degradiert wird.

3.2.3 Untersuchungen zur Topologie von Cbs1p

Der molekulare Wirkort von Cbs1p, die mitochondriale Matrix, wird durch seine Funktion - Aktivierung der Apocytochrom *b* Synthese - definiert. Experimentell wurde jedoch noch nicht belegt, ob das Protein ausschließlich matrixseitig an der inneren Membran lokalisiert vorliegt oder ob Teile des Proteins in den Intermembranraum ragen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die C-terminale Deletion (Cbs1p Δ (193-204)) zu einer veränderten Topologie oder Lokalisierung führt.

Dazu wurden Mitochondrien, deren äußere Membran durch „osmotisches Schwellen“ aufgebrochen wurde („shocked mitochondria“), mit steigenden Konzentrationen von Proteinase K behandelt. Die Persistenz eines Proteins bzw. Teile eines Proteins gegenüber dieser Behandlung (vorausgesetzt, es ist nicht *per se* proteinaseresistent) gibt Auskunft über die vollständige bzw. partielle matrixseitige Lokalisation des Proteins, da die innere Mitochondrienmembran eine Barriere für die Proteinase K

darstellt. Erst bei hohen Konzentrationen von Proteinase K (bzw. bei längerer Inkubation) oder bei der Solubilisierung der Membran durch Detergenzien werden auch Proteine des Matrixkompartiments für die Proteinase angreifbar.

Cbs1p liegt in der mitochondrialen Matrix Proteinase K-geschützt vor

Mitochondrien wurden aus dem Cbs1p::3HA exprimierenden (authentischer Promotor, single-copy Vektor) $\Delta cbs1$ -Stamm UKB1 isoliert und durch hypoosmotische Bedingungen mitoplastiert. 80 µg-Aliquots der „shocked mitochondria“ wurden mit steigenden Konzentrationen von Proteinase K jeweils in An- oder Abwesenheit von 1 % Triton X-100 versetzt. Triton X-100 solubilisiert die innere Membran und verschafft so der Proteinase Zugang zu den Matrixproteinen. Als Kontrollen dienten Hsp70p, ein lösliches Protein der mitochondrialen Matrix (Schilke *et al.*, 1996), sowie Sco1p, ein integrales Protein der inneren Mitochondrienmembran (Buchwald *et al.*, 1991), dessen Hauptanteil in den Intermembranraum ragt (Abb. 16 A).

Cbs1p wird ab einer Proteinasekonzentration von 50 µg/ml in Anwesenheit von 1 % Triton X-100 (Spuren 8 und 9) vollständig abgebaut und erweist sich somit als Proteinase K-sensitiv. Damit kann die unveränderte Signalstärke der Cbs1p-spezifischen Bande unter steigenden Proteinase K-Konzentrationen (Spuren 2 bis 4) als Beleg gewertet werden, dass sich Cbs1p vollständig im Proteinase K-geschützten Kompartiment befindet.

Die Intensitätsabnahme der Cbs1p-spezifischen Bande bei Zusatz von Proteinase K im Vergleich zur unbehandelten Probe (Spur 1) ist vermutlich auf Mitochondrien mit geschädigter innerer Membran zurückzuführen. Dem widerspricht scheinbar die unverändert bleibende Signalstärke von Hsp70p (Spuren 1 und 2). Da allerdings Hsp70p bei gleichen Proteinase K-Konzentrationen in Anwesenheit von Triton X-100 (Spuren 6 und 7) kaum abgebaut wird, erklärt sich der Unterschied aus der geringeren Proteinase K-Sensitivität von Hsp70p.

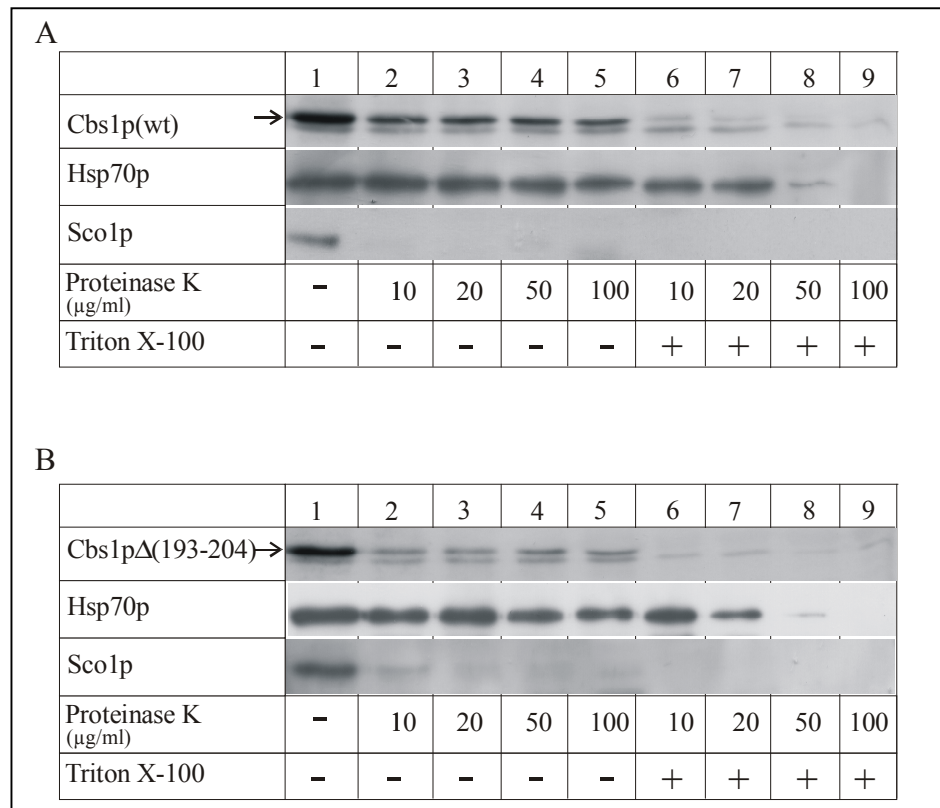


Abb. 16: Topologie von Cbs1p und Cbs1pΔ(193-204)

Mitochondrien, isoliert aus dem Cbs1p::3HA (A) bzw. Cbs1p Δ(193-204)::3HA (B) exprimierenden (authentischer Promotor, single-copy Vektor) Δ*cbs1*-Stamm UKB1, wurden mitoplastiert. 80 µg-Aliquots der „shocked mitochondria“ wurden mit steigender Konzentration an Proteinase K jeweils in An- oder Abwesenheit von 1 % Triton X-100 behandelt. Zur Kontrolle wurden das Matrixprotein Hsp70p und das zum Intermembranraum gerichtete Sco1p immundetektiert.

Cbs1p verhält sich unter den getesteten Bedingungen wie das Matrixprotein Hsp70p, während sich Sco1p schon bei der niedrigsten Proteinasekonzentration kaum noch nachweisen lässt. Da sich der 3HA-tag am C-Terminus von Cbs1p befindet und auch keine Verkürzung des Proteins durch die Proteinasebehandlung detektiert werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass Teile des Proteins in den Intermembranraum ragen. Dieser Befund bestätigt somit das Ergebnis der biochemischen Charakterisierung der Membranassoziation, nach der Cbs1p über keinen transmembranen Anker verfügt.

Cbs1p Δ (193-204) verhält sich wie das Wildtypprotein hinsichtlich der Proteinase K-Behandlung

Die veränderte Löslichkeit der C-terminal deletierten Proteine (s. 3.2.2.2.3) könnte eine veränderte Topologie und/oder Lokalisierung innerhalb der Mitochondrien als Ursache haben. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Mitochondrien aus Zellen der Nullmutante UKB1, die Cbs1p Δ (193-204)::3HA exprimieren, isoliert und der Proteinase K-Behandlung unterzogen (Abb. 16 B). Das Cbs1p-Derivat weist die gleichen Charakteristika der Proteinase K-Zugängigkeit auf wie das Wildtypprotein. Die Signalstärke der Bande bleibt beim Zusatz der Proteinase K in steigender Konzentration konstant (Spuren 1 bis 4). Eine im Vergleich zu Spur 2 10fach höhere Proteinase K-Konzentration (Spur 4) führt nur bei Anwesenheit von Triton X-100 zum Verdau des Proteins. Auch hier kann keine schneller migrierende Proteinspezies nachgewiesen werden, wie sie entstehen könnte, wenn der N-Terminus - etwa bei Importarrest - in den Zwischenmembranraum ragt. Die Deletion des hydrophoben Bereiches (As 193-204) führt demnach nicht zu einer Veränderung der submitochondrialen Lokalisierung und Topologie des Proteins.

3.3 Mutagenese des CBS1-Gens

Zur Identifizierung funktionell wichtiger Aminosäuren bzw. Proteinbereiche wurden verschiedene Mutagenese-Methoden eingesetzt. Da es - bis auf eine Ausnahme (ATP-Bindemotiv, vgl. 3.3.2.1) - keine Hinweise auf funktionsrelevante Motive gibt, wurde mittels PCR unter mutagenen Bedingungen eine Schar von Mutanten kreiert, deren Phänotyp hinsichtlich des Wachstums auf nicht-vergärbarem Substrat untersucht wurde. Weitere interessante Bereiche des Proteins, wie der C-Terminus, der aufgrund seiner hydrophoben Natur schon im Rahmen der Membranassoziation untersucht wurde, und der N-Terminus mit der abspaltbaren Präsequenz, wurden durch gezielte Mutagenese modifiziert, um Aufschluss über struktur- und/oder funktions-determinierende Aminosäuren bzw. Proteinsegmente zu erhalten.

3.3.1 „random“-Mutagenese von CBS1

Durch geeignete Bedingungen kann die ohnehin schon hohe Fehlerrate von Polymerasen, denen die sogenannte „proof-reading“ Aktivität fehlt (z.B. *Taq*-Polymerase, Literaturangaben zur Fehlerrate: $8,9 \times 10^{-5}$ /bp (Cariello *et al.*, 1991) bis $1,1 \times 10^{-4}$ /bp (Keohavong and Thilly, 1989)), weiter gesteigert werden. Zu diesen Bedingungen zählen u.a. der Zusatz von MnCl_2 oder von nichtäquimolaren (unbalancierten) Gemischen der dNTPs mit jeweils einem Nukleosidtriphosphat in limitierender Konzentration im PCR-Reaktionsansatz (Shafikhani *et al.*, 1997).

Für die Amplifizierung des CBS1-Allels (von -319 bis +702 bezüglich A⁺1TG) mit den Primern #5 und #2 (Template: pRS415 Cbs1p) unter mutagenen Bedingungen wurde die PCR-Reaktion zum einen in Gegenwart von 0,5 mM MnCl_2 durchgeführt. Zum anderen wurde in vier weiteren PCR-Ansätzen jeweils eines der dNTPs in limitierender Konzentration (0,02 mM) eingesetzt, die übrigen wurden in der üblichen Konzentration von 0,2 mM verwendet. Die PCR-Zyklusbedingungen entsprachen jenen des Standardprogramms (s. 2.2.2.3.1).

Die PCR-Produkte wurden vereinigt, gelelektrophoretisch vom Template getrennt und durch Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurden die PCR-Fragmente mit *XbaI/BamHI* gespalten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pRS415 kloniert. Nach der Ligation und Transformation in *E. coli* wurden ca. 3×10^4 Ampicillin-resistente Klone „gepoolt“ und zur Präparation der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Schar von Plasmiden wurde in die *cbs1*-Nullmutante UKB1 transformiert und auf plasmidtragende Transformanten auf Minimalmedium ohne Leucin selektiert. Anschließend wurden diese auf YPEG-Platten überstempelt und bei 23°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert. Transformanten, die nach 2-4 Tagen bei den genannten Temperaturen ein vom Wildtyp abweichendes Wachstum aufwiesen, wurden erneut auf Selektionsmedium ausgestrichen und auf YPEG-Platten überstempelt. Um auszuschließen, dass der Atmungsdefekt einiger Klone auf das Fehlen der mtDNA (*rho*⁰) zurückzuführen ist, wurden diese im *PET*-Test (s. 2.2.1.1) untersucht. Von *rho*⁺-Klonen, deren vom wt-abweichendes Wachstum auf Glycerin-Ethanol-Medium bestätigt werden konnte, wurde die Plasmid-DNA isoliert (s. 2.2.2.8) und das *cbs1*-Allel sequenziert. Zur Verifizierung des Mutanten-Phänotyps wurden die Plasmide erneut in die Nullmutante UKB1 transformiert und der Phänotyp wie beschrieben charakterisiert. Die so identifizierten Mutantenallele sind in Tab. 5 dargestellt.

Eine Reihe von Mutationen (Tab. 5; #1, #2, #6, #15, #17, #20) führen durch Stopp-Codons zum vorzeitigen Abbrechen der Polypeptidkette. Die z.T. stark verkürzten Mutanten-Proteine sind bei allen getesteten Temperaturen nicht in der Lage, den rd-Phänotyp der *cbs1*-Nullmutante zu komplementieren (Tab. 5). Interessanterweise kodiert das Mutantenallel #20 für ein C-terminal um 8 As trunkiertes Protein, welches ebenfalls nicht funktionell ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde der „directsite“-Mutagenese des Cbs1p C-Terminus (s. 3.3.2.2.1), dass der extreme C-Terminus des Proteins wichtig für die Funktion ist.

Nr.	Mutation		Phänotyp: Wachstum auf YPEG			Mutagenese/ Herkunft
			23°C	30°C	37°C	
	DNA	Protein				
1	G(60)Δ C(301)T	As 1-20 authentisch Q(101)Stopp	-	-	-	random
2	T Insertion nach A(201)	K(68)Stopp	-	-	-	random
3	T(242)C A(283)C	V(81)A T(95)P	+	++	+	random
4	A(305)G	K(102)R	+	+	+	random
5	G(311)A	G(104)D	-	-	-	<i>cbs1-1</i> Allel aus MK2
6	Deletion T(336)	As 1-112 authentisch	-	-	-	random
7	A(338)G	N(113)S	+++	+++	+++	random
8	T(359)C	F(120)S	+++	+++	+++	random
9	T(383)A	I(128)T	+++	+++	-	random
10	T(398)C	F(133)S	-	-	-	random
11	T(398)A	F(133)Y	-	-	-	random
12	C(518)A	P(173)Q	++	++	-	direct
13	A(565)G	N(189)D	-	-	-	random
14	A(629)G	N(210)S	-	-	-	random
15	Deletion A(636)	As 1-211 authentisch	-	-	-	random
16	T(664)N; G(665)N	C(222)P;T,F,A,N,V,H	+++	+++	+++	direct
17	Deletion G(665)	As 1-221 authentisch	-	-	-	random
18	T(668)A	I(223)K	+++	+++	+++	direct
19	C(671)G	P(224)R	+++	+++	+++	direct
20	C Insertion nach C(673)	As 1-224 authentisch	-	-	-	random
21	T(682)G	Y(228)D	+++	+++	+++	direct
22	A(683)T	Y(228)F	+++	+++	+++	direct

Tab. 5: Übersicht zu den durch „random“- bzw. „directsite“-Mutagenese kreierte *cbs1*-Mutantenallele

Die Positionen der Mutationen auf DNA-Ebene sowie die daraus resultierenden Veränderungen der Cbs1p-Primärstruktur sind angegeben. Das Wachstum der entsprechenden UKB1-Transformanten auf nicht-vergärbarem Medium (YPEG) wurde nach 2-4 d ausgewertet: „+++“ wt-entsprechendes, „++“ reduziertes, „+“ stark reduziertes bzw. „-“ kein Wachstum.

Der Hauptanteil der identifizierten Mutationen gruppiert sich im zentralen Bereich des Proteins zwischen den As 102 und 133. Dabei beeinträchtigen die As-Austausche an den Positionen N(113)S und F(120)S die Funktion von Cbs1p nicht bzw. an Position I(128)T nur bei nicht-permissiver Temperatur (37°C). Hingegen sind die As G(104)D und F(133)S/Y offensichtlich essentiell für die Funktion, da die entsprechenden Mutanten-Proteine (#5 bzw. #10 und #11) nicht in der Lage sind, dass wt-Protein zu ersetzen. Interessanterweise ist F(133)S/Y Bestandteil eines Sequenz-Motivs, das im Zusammenhang mit einer potentiellen RNA-Bindung diskutiert wird (RNP1-Konsensus: [KR]G[FY][GA][FY][IV]x[FY]; (Query *et al.*, 1989)). K(102)R scheint strukturelle Bedeutung zu besitzen, da bereits der Austausch gegen die ebenfalls positiv geladene As Arginin zur starken Reduzierung des Wachstums der transformierten Nullmutante auf Glycerin-Ethanol-Medium führt (Tab. 5). Erwähnenswert ist, dass der hier betrachtete Bereich, der von den Mutationen K(102)R und F(133)S/Y eingeschlossen wird, Homologie zu einem Hitzeschock-Protein (Hsp22p) von *Rickettsia prowazekii* (46 % Identität über den Bereich der As 127-158) und zu einer Maturase (U58574) von *Perideridia gairdneri* (48 % Identität über den Bereich der As 105-135) aufweist. Die beschriebenen Homologien werden im Diskussionsteil näher erläutert.

Substitutionen von As im C-terminalen Drittel N(189)D bzw. N(210)S (Mutanten #13 bzw. #14) resultieren in einem nicht-funktionellen Protein. Offensichtlich handelt es sich an diesen Positionen um struktur- und/oder funktionsdeterminierende Aminosäuren. Die Mutation N(210)S liegt interessanterweise im hydrophilen Segment zwischen den hydrophoben Bereichen, die durch „directsite“-Mutagenese (s. 3.3.2.2.1) bzw. biochemisch (s. 3.2.2.2.3) näher untersucht wurden. Da die Position N(210) in den Deletionsmutanten Cbs1p Δ (193-204) bzw. Cbs1p Δ (215-228) unverändert vorliegt, beruht der Ausfall der Komplementationsfähigkeit durch Deletion der hydrophoben Bereiche (As 193-204 bzw. As 215-228) nicht auf dieser Punktmutation.

3.3.2 „directsite“-Mutagenese von *CBS1*

3.3.2.1 Analyse von Mutationen interner Proteinbereiche

Beim Vergleich der Cbs1p-Primärsequenz mit bekannten Proteinmotiven aus verschiedenen Datenbanken (e-motif-search) wird ein ATP-Bindemotiv ([ilmv]p...gl.ss[as]; GHMP-Kinases-ATP; BL00627) im Bereich der As 172 und 182 vorhergesagt. Um zu testen, ob dieser Bereich essentiell für die Funktion des Proteins ist, wurde das hoch konservierte Prolin innerhalb des Motives durch Glutamin (Abb. 15; P(173)Q) ersetzt. Diese Mutation wurde über „overlap-extension“-PCR (s. 2.2.2.10) unter Verwendung der Primerpaare #5/#3 bzw. #4/#2 für die erste separate Amplifikation der beiden überlappenden Teilprodukte sowie des Primerpaars #5/#2 für die finale PCR eingeführt. Das PCR-Produkt und der Vektor pRS415 wurden mit *Xba*I und *Bam*HI geschnitten und ligiert. Das resultierende Plasmid (pRS415 Cbs1p-ATP) wurde sequenziert und in den Hefestamm UKB1 transformiert. Das Wachstum der Transformanden wurde auf Glycerinmedium bei 23°C, 30°C und 37°C getestet.

Das Prolin(173) ist wichtig für die Funktion von Cbs1p

Das Mutanten-Protein Cbs1p-ATP mit der Substitution von Prolin(173), das sich innerhalb des putativen ATP-Bindemotivs befindet, durch Glutamin ist in der Lage, den Atmungsdefekt der Nullmutante bei 23°C und 30°C zu komplementieren (s. Tab. 5, Mutante #12). Bei diesen Temperaturen zeigen die entsprechenden UKB1-Transformanden ein leicht reduziertes Wachstum auf Glycerinmedium. Bei 37°C konnte kein Wachstum beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass Prolin(173) zwar wichtig für die Funktion des Proteins ist, aber möglicherweise nicht als Bestandteil eines ATP-Bindemotivs fungiert. In letzterem Fall würde man einen Ausfall der Atmung bei allen getesteten Temperaturen erwarten, da der hohe Grad an Konservierung des Prolin-Rests innerhalb dieses Motivs eine essentielle Bedeutung impliziert.

3.3.2.2 Analyse von Mutationen im C-terminalen Bereich

Der C-Terminus von Cbs1p weist neben den bereits beschriebenen hydrophoben Bereichen eine Clusterung positiver Ladungen (As H(229)LRKS(233)) auf, deren Einfluss auf die Funktion des Proteins untersucht werden soll. Außerdem wurden einzelne Aminosäuren innerhalb des distalen hydrophoben Bereiches (As 215-228) mutiert, um ihre funktionelle Bedeutung zu bestimmen.

Die Mutationen am extremen C-Terminus wurden mit entsprechend modifizierten Primern über PCR eingeführt (Tab. 6). Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung der angegebenen Restriktionsenzyme (Tab. 6) in den Vektor pRS415 kloniert.

Konstrukte	Primer 1	Primer 2	Schnittstellen der Restriktionsenzyme
Cbs1p R(231)H; K(232)H	#5	#22	XbaI/BamHI
Cbs1p H(229)K; R(231)K	#5	#21	XbaI/BamHI
Cbs1p K(232)E	#5	#18	XbaI/BamHI
Cbs1p R(231)E; K(232)E	#5	#19	XbaI/BamHI
Cbs1p H(229)E; R(231)E; K(232)E	#5	#20	XbaI/BamHI
Cbs1p (229-233)Q	#5	#25	XbaI/BamHI
Cbs1p H(229)Q; R(231)Q; K(232)Q	#5	#26	XbaI/BamHI
Cbs1p (229-232)Q	#5	#27	XbaI/BamHI
Cbs1p Δ(222-233)	#5	#13	XbaI/BamHI
Cbs1p Δ(215-233)	#5	#12	XbaI/BamHI
Cbs1p Δ(192-233)	#5	#11	XbaI/BamHI
Cbs1p Δ(229-233)	#5	#14	XbaI/BamHI
Cbs1p Δ(215-228)	#1	#10	NcoI/XbaI
Cbs1p Δ(222,223)	#5	#24	XbaI/BamHI
Cbs1p C(222)X	#5	#6	XbaI/BamHI
Cbs1p I(223)K	#1	#23	NcoI/XbaI
Cbs1p Y(228)F	#5	#28	XbaI/BamHI
Cbs1p Y(228)D	#5	#29	XbaI/BamHI
Cbs1p P(224)R	#5	#30	XbaI/BamHI

Tab. 6: „directsite“-Mutagenese im C-terminalen Bereich von Cbs1p

Übersicht zu den in den Vektor pRS415 klonierten PCR-Fragmente mit Angabe der eingesetzten Primerpaare und der für die Klonierung verwendeten Schnittstellen:

X= A, F, H, N, P, T oder V; Δ=Deletion.

Die erhaltenen Plasmide wurden nach der Sequenzierung in die *cbs1*-Nullmutante UKB1 transformiert und jeweils 10 der resultierenden Transformanten erneut auf Selektionsmedium ohne Leucin ausgestrichen. Nach 2 Tagen Wachstum bei 30°C wurden diese auf YPEG-Platten überstempelt, bei 23°C, 30°C bzw. 37°C inkubiert und das Wachstum nach 2 Tagen ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde die Nullmutante mit dem *CBS1*-Wildtypallel tragenden Plasmid transformiert. Die Ergebnisse der Mutagenese sind in Abb. 17 zusammengefasst.

3.3.2.2.1 Analyse C-terminaler Deletionen

Um den Einfluss des C-terminalen Bereiches auf die Funktion des Proteins zu untersuchen, wurde dieser zunächst sukzessive verkürzt und das Komplementationsverhalten der resultierenden Mutantenallele auf nicht-vergärbarem Medium getestet (Abb. 17). Bereits die Entfernung der distalen 5 As führt zu reduziertem Wachstum bei 30°C bzw. zum Ausfall des Wachstums auf YPEG-Medium außerhalb der permissiven Temperatur (30°C). Proteine mit C-terminalen Verkürzungen um 12, 19 bzw. 42 As sind nicht in der Lage, den rd-Phänotyp der Nullmutante bei den gewählten Temperaturen zu komplementieren. Zum gleichen Ergebnis führt die Deletion des proximalen (As 193-204) bzw. distalen (As 215-228) hydrophoben Segmentes. Wichtige Bereiche für die Funktion des Proteins liegen offensichtlich im extremen C-Terminus und sollen im weiteren detaillierter untersucht werden.

Die positiv geladenen Aminosäuren am extremen C-Terminus können durch andere positive geladene Aminosäuren ersetzt werden

Der distale hydrophobe Bereich wird C-terminal durch einen Cluster von drei positiven Ladungen flankiert [H(229), R(231) und K(232)]. Zunächst wurde getestet, ob die positiven Ladungen *per se* oder andere physikochemische Eigenschaften dieser Aminosäuren von Bedeutung sind. Dazu wurden R(231) und K(232) durch Histidin bzw. H(229) und R(231) durch Lysin substituiert.

Das Wachstum der mit pRS415 Cbs1p [R(231)H; K(232)H] bzw. pRS415 Cbs1p [H(229)K; R(231)K] transformierten Nullmutante auf Glycerin-Ethanol-Medium ist vergleichbar mit dem der wt-Allel tragenden Kontrolltransformande (Abb. 17). Dieses Ergebnis belegt, dass die positive Ladung nicht von einer spezifischen Aminosäure eingebracht werden muss.


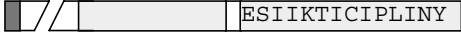








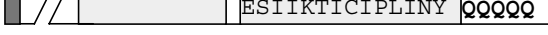

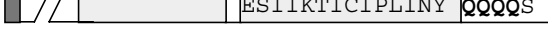

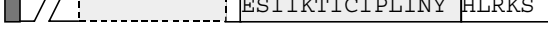

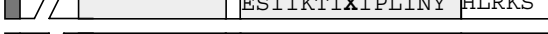
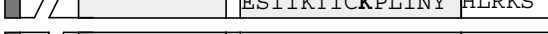
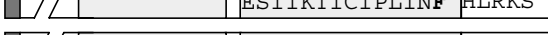
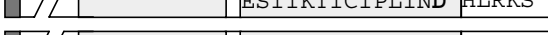
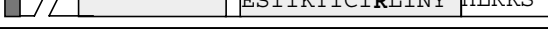
		Wachstum auf YPEG bei		
		23°C	30°C	37°C
Cbs1p		+++	+++	+++
Cbs1p Δ(229-233)		-	++	-
Cbs1p Δ(222-233)		-	-	-
Cbs1p Δ(215-233)		-	-	-
Cbs1p Δ(192-233)		-	-	-
Cbs1p R(231)H; K(232)H		+++	+++	+++
Cbs1p H(229)K; R(231)K		+++	+++	+++
Cbs1p K(232)E		+++	+++	+++
Cbs1p R(231)E; K(232)E		+++	+++	+++
Cbs1p H(229)E; R(231)E; K(232)E		+++	+++	+++
Cbs1p (229-233)Q		+++	+++	+++
Cbs1p H(229)Q;R(231)Q;K(232)Q		+++	+++	+++
Cbs1p (229-232)Q		+++	+++	+++
Cbs1p Δ(215-228)		-	-	-
Cbs1p Δ(193-204)		-	-	-
Cbs1p Δ(222,223)		+	+	-
Cbs1p C(222)X		+++	+++	+++
Cbs1p I(223)K		+++	+++	+++
Cbs1p Y(228)F		+++	+++	+++
Cbs1p Y(228)D		+++	+++	+++
Cbs1p P(224)R		+++	+++	+++

Abb. 17: **Komplementationsverhalten von *cbs1*-Allelen mit C-terminalen Mutationen**

Die *cbs1*-Allele wurden in die *cbs1*-Nullmutante UKB1 transformiert und das Wachstum der Transformanden auf nicht-vergärbarem Medium (YPEG) bei den angegebenen Temperaturen getestet: „+++“ wt-entsprechendes, „++“ reduziertes, „+“ stark reduziertes bzw. „-“ kein Wachstum. Als Kontrolle wurde das wt-Allel transformiert. Die entsprechenden Proteine sind schematisch dargestellt und enthalten neben der Lage der Präsequenz (As 1-29:■) und der hydrophoben C-terminalen Segmente (■) auch die Primärsequenz des C-terminalen Bereiches (As 215-233) mit der Angabe der durch die Mutationen betroffenen As (**fett**):

X= A, F, H, N, P, T oder V, Δ = Deletion.

Die positiven Ladungen am extremen C-Terminus sind nicht wichtig für die Funktion von Cbs1p

Nachdem gezeigt wurde, dass die positiven Ladungen nicht durch definierte As eingebracht werden müssen, sollte die Frage geklärt werden, ob die Nettoladung des Clusters wichtig für die Funktion des Proteins ist. Um dies zu testen, wurden die positiven Ladungen sukzessive durch negative Ladungen ersetzt (Cbs1p K(232)E, Cbs1p [R(231)E; K(232)E], Cbs1p [H(229)E; R(231)E; K(232)E]). Die eingeführten Mutationen resultieren in einer Ladungsverschiebung des betrachteten Bereiches von +3 über +1; -1 bis zu -3. Diese Mutationen bleiben überraschenderweise ohne Auswirkung auf das Wachstum der entsprechenden Transformanten auf nicht-vergärbarem Substrat (Abb. 17). Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn alle positiv geladenen Aminosäuren durch die ungeladene Aminosäure Glutamin ausgetauscht werden (Cbs1p [H(229)Q; R(231)Q; K(232)Q]). Da die positiv geladenen As durch negativ geladene bzw. ungeladene As ausgetauscht werden können, ohne das Wachstum auf nicht-vergärbaren C-Quellen zu beeinflussen, kann geschlossen werden, dass weder die positive noch irgendeine Ladung des extremen C-Terminus essentiell für die Funktion von Cbs1p ist.

Der extreme C-Terminus besitzt offensichtlich keine einzeln struktur- und/oder funktionsdeterminierenden As, sondern fungiert als Gesamtheit zur Aufrechterhaltung der Cbs1p Funktion

Wird der gesamte C-terminale Bereich (As 229-233) deletiert, so sind die entsprechenden UKB1-Transformanten [pRS415 Cbs1p Δ (229-233)] nicht mehr in der Lage, bei 23°C und 37°C auf YPEG zu wachsen (Abb. 17). Bei 30°C zeigen diese Transformanten ein reduziertes Wachstum. Wenn, wie oben beschrieben, weder die Nettoladung noch die Spezifität der geladenen Aminosäuren von Bedeutung für die Funktion des Proteins sind, so könnten die Aminosäuren L(230) oder S(233), die bisher nicht verändert wurden, der Grund für die drastische Auswirkung der Deletion des Gesamtbereiches auf das Wachstum bei 23°C bzw. 37°C sein. Erstaunlicherweise können aber auch diese Aminosäuren gegen Glutamin (Cbs1p (229-233)Q und Cbs1p (229-232)Q) ausgetauscht werden, ohne dass die Funktion von Cbs1p beeinträchtigt wird. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten,

dass nicht die Präsenz einzelner Aminosäuren des extremen C-Terminus (As 229-233) von funktioneller Bedeutung ist, sondern dass der Bereich als Einheit für die Aufrechterhaltung der Proteinfunktion zumindest bei 23°C und 37°C essentiell ist. Denkbar wäre, dass diese Region beispielsweise für die Stabilität des Proteins notwendig ist.

3.3.2.2.2 Immunochemische Charakterisierung der C-terminalen Deletionsmutanten

Der Einfluss der hydrophoben Segmente auf das Löslichkeitsverhalten wurde bereits in Abschnitt 3.2.2.2.3 untersucht. Mit den folgenden Analysen wird der Frage nachgegangen, ob die Deletion der hydrophoben Bereiche (einzeln oder zusammen) dem Ausfall oder der Veränderung einer bestimmten Cbs1p-Funktion zugeordnet werden kann.

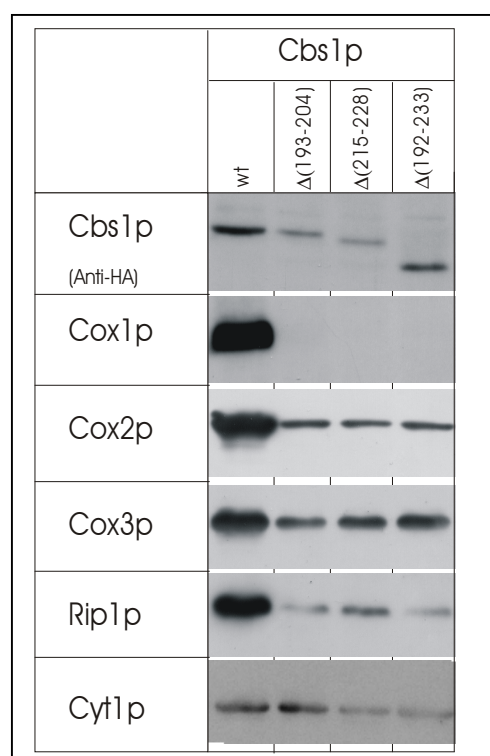


Abb. 18: Auswirkungen C-terminaler Deletionen von Cbs1p auf die Konzentration von Untereinheiten der Komplexe III und IV

Die *cbs1*-Nullmutante wurde mit dem wt-Allel bzw. den C-terminal deletierten *CBS1*-Allelen transformiert und die Mitochondrien isoliert. Für die Western-Analyse wurden gleiche Proteinmengen (60 µg) aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine.

Dazu wurden Mitochondrien der mit pRS415Cbs1p Δ (193-204), pRS415Cbs1p Δ (215-228) bzw. pRS415Cbs1p Δ (192-233) transformierten Nullmutante isoliert und je 60 μ g mitochondriale Proteine im PAA-Gel aufgetrennt.

Nach dem immunologischen Nachweis der HA-tag tragenden Cbs1p-Derivate wurden die Blots mit Antikörpern gegen Cox1p, Cox2p, Cox3p, Rip1p bzw. Cyt1p immundekoriert (Abb. 18).

Cox1p wird in der Nullmutante in Anwesenheit von C-terminal deletiertem Cbs1p nicht exprimiert

Aus Markierungsexperimenten mitochondrialer Translationsprodukte war bekannt, dass der Ausfall von Cbs1p sekundär auch zum Ausfall der Cox1p-Synthese führt (Rödel *et al.*, 1986). Der Grund liegt im bl4p-Maturase-abhängigen Spleißen des al4-Introns der COX1 prä-mRNA (s. Einleitung). In den hier untersuchten Mitochondrien-Isolaten konnte nur in Anwesenheit von funktionellem Cbs1p Cox1p nachgewiesen werden (Abb. 18). Somit kann ausgeschlossen werden, dass der N-terminale Bereich der Deletionsmutanten beispielsweise in der Lage ist, eigenständig die Translation der COB-mRNA einzuleiten (bis zur Bildung der bl4p-Maturase), bzw. dass dieser Bereich Maturase-Funktion besitzt.

Cox2p und Cox3p sind in Mitochondrien-Lysaten der untersuchten Deletionsmutanten reduziert

Wie aus Abb. 18 hervorgeht, liegen Cox2p und Cox3p gleichermaßen in geringerer Konzentration vor, wenn C-terminal deletierte Cbs1p-Derivate in der *cbs1*-Nullmutante exprimiert werden. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da beim Fehlen einer Untereinheit (Cox1p) der Cytochrom-Oxidase die Assemblierung des Komplexes gestört ist (Glerum and Tzagoloff, 1997). In Folge wird die „steady-state“ Konzentration an nicht assemblierten Untereinheiten durch Erhöhung der „turnover-rate“ reduziert.

Die Untereinheiten von Komplex III Cytochrom c_1 und Rip1p (Fe/S-Protein) - werden in unterschiedlichem Maße beeinflusst

Bei Abwesenheit von Cbs1p wird, wie bereits beschrieben (s. Einleitung), keine COB-mRNA translatiert. Somit fehlt Cytochrom *b* als integraler Bestandteil des Komplexes III der Atmungskette. Studien zur Assemblierung von Komplex III belegen (Rep and Grivell, 1996b), dass beim Fehlen von Cytochrom *b* weitere Untereinheiten des Komplexes reduziert vorliegen, da nicht-assemblierte Komponenten proteolytisch abgebaut werden. Dieses Phänomen wird im Fall von Rip1p (Fe/S-Protein, Abb. 18) deutlich. Die Konzentration an Rip1p in Mitochondrien der Nullmutante in Anwesenheit von C-terminal verkürztem Cbs1p sinkt dramatisch im Vergleich zu Cbs1p(wt). Interessanterweise wird Cytochrom c_1 (Cyt1p) unter den getesteten Bedingungen vergleichsweise weniger beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich zwischen den C-terminalen Mutationen keine Unterschiede hinsichtlich der getesteten phänotypischen Parameter detektieren lassen.

3.3.2.2.3 Untersuchung zur Bedeutung prominenter Aminosäuren im distalen hydrophoben Bereich (As 215-228)

Um die Bedeutung des distalen hydrophoben Bereiches (As 215-228) detaillierter analysieren zu können, wurden die As [C(222); P(224); Y(228) und I(223)] dieses Bereiches mutagenisiert und die entsprechenden *cbs1*-Allele in die Nullmutante transformiert. Die Komplementationsfähigkeit der Mutantenallele wurde auf nicht-vergärbarem Medium getestet (Abb. 17).

Cystein(222) ist nicht in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert

Um zu testen, ob der zentrale Cysteinrest im distalen hydrophoben Segment für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich sein könnte, wurde C(222) durch eine zufällige Auswahl von As (A, F, H, N, P, T, V) durch „directsite“-Mutagenese substituiert (Tab. 6) und deren Einfluss auf das Wachstum der entsprechenden

UKB1-Transformanden auf Glycerin-Ethanol-Medium untersucht (Abb. 17). Ungeachtet der physikochemischen Eigenschaften der eingeführten As, vermittelten die resultierenden Mutantenproteine der *cbs1*-Nullmutante UKB1 ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum auf nicht-vergärbarem Medium unter den angeführten Bedingungen. Offensichtlich ist C(222) nicht notwendig für die Funktion von Cbs1p und kann aus diesem Grund kein essentieller Bestandteil einer Protein-Protein-Interaktionsstelle sein.

Der hydrophobe Charakter des distalen Segmentes scheint nicht essentiell für die Funktion des Proteins zu sein

Die oben angeführten Substitutionen von C(222) beinhalten auch polare und geladene As, die einen dramatischen Effekt auf den hydrophoben Charakter dieses Segmentes haben. Ähnliche Auswirkungen auf die Hydrophobizität besitzen die As-Austausche I(223)K, P(224)R bzw. Y(228)D (s. Tab. 6 und Abb. 17). Alle aufgeführten Mutationen haben keinen Einfluss auf das Wachstum der UKB1-Transformanden auf Glycerin-Ethanol-Medium. Diese Ergebnisse deuten auf ein ähnliches Phänomen hin, wie es bereits bei der Substitution von As am extremen C-Terminus beschrieben wurde. Möglicherweise wird die Funktion des distalen hydrophoben Bereiches und des extremen C-Terminus nur durch die Gesamtheit der Aminosäuren determiniert. Ein Hinweis darauf, dass eine bestimmte Länge des hydrophoben Bereiches von funktioneller Bedeutung sein könnte, gibt die Analyse des Wachstums der C(222)/I(223) Doppel-Deletionsmutante (Cbs1p Δ (222,223)) auf YPEG-Medium (Abb. 17). Im Gegensatz zur Substitution der einzelnen As vermittelt die Deletion beider Aminosäuren ein reduziertes Wachstum der entsprechenden UKB1-Transformande bei 23°C und 30°C. Bei 37°C kann der rd-Phänotyp der Nullmutante nicht komplementiert werden.

3.3.2.3 Analyse von Mutationen im N-terminalen Bereich

Die ersten 29 Aminosäuren des Cbs1p-Vorläuferproteins werden beim Import in die Mitochondrien abgespalten (Körte *et al.*, 1989). Dies impliziert, dass es sich bei diesem Bereich um eine mitochondriale Importsequenz handeln könnte.

Bekannt war außerdem, dass ein Cbs1p-Konstrukt, welches die As 77-233 beinhaltet, nur bei starker Überexpression in der Lage ist, die Nullmutante zu komplementieren (Körte *et al.*, 1989). Interessanterweise vermittelt jedoch ein N-terminal trunkiertes Cbs1p ohne Präsequenz (Cbs1p $\Delta(1-29)$) unter authentischer Expression (single-copy Vektor, authentischer Promotor) in den entsprechenden UKB1-Transformanden ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abb. 19) (Krause-Buchholz *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass die ersten 29 As des Proteins für einen Import in die Mitochondrien nicht notwendig sind. Um die Funktion des N-Terminus näher zu untersuchen, wurde eine Serie von Deletionsmutanten kreiert, denen 0, 29, 76, 82 bzw. 96 N-terminale As fehlen. Dazu wurden die entsprechenden Fragmente unter Verwendung des Primers #33 in Kombination mit den Primern #34; #35; #36; #38 bzw. #39 mittels PCR amplifiziert. Das Startcodon (ATG) wurde bei den Konstrukten Cbs1p $\Delta(1-29)$ und Cbs1p $\Delta(1-96)$ über die eingesetzten PCR-Primer eingeführt. Die *Bam*HI/*Sal*I-geschnittenen PCR-Produkte wurden in den Vektor pRS415-*CBS1*Prom kloniert, der den Promotorbereich des *CBS1*-Genes (-319 bis -1 bezüglich A⁺1TG des *CBS1*-Leserahmens) als *Not*I/*Bam*HI Fragment bereits enthält. Die erhaltenen Plasmide (pRS415-*CBS1*Prom:Cbs1pN1-233; pRS415-*CBS1*Prom:Cbs1p $\Delta(1-29)$; pRS415-*CBS1*Prom:Cbs1p $\Delta(1-76)$; pRS415-*CBS1*Prom:Cbs1p $\Delta(1-82)$; pRS415-*CBS1*Prom: Cbs1p $\Delta(1-96)$) wurden sequenziert und in die Nullmutante UKB1 transformiert. Von den resultierenden Transformanden wurden jeweils 10 auf Selektivmedium ausgestrichen. Diese Ausstriche wurden zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens auf nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen auf Glycerin-Ethanol-Platten überstempelt und bei 23°C, 30°C und 37°C inkubiert (Abb. 19).

Die As 30-76 sind wichtig für die Funktion von Cbs1p

Durch die Klonierung der N-terminal verkürzten Cbs1p-Derivate wurde der sich unmittelbar 5'-seitig anschließende Bereich des *CBS1*-Gens durch das Einführen einer Schnittstelle verändert. Da sich die mit pRS415-*CBS1*Prom:Cbs1pN1-233 transformierte UKB1-Nullmutante nicht im Wachstum auf YPEG-Medium vom Wildtyp unterscheidet (Abb. 19), kann davon ausgegangen werden, dass die beschriebenen Veränderungen infolge der Klonierung zu keiner Beeinflussung der Transkription des

Genes führen. Wie bereits beschrieben (s. oben), ist das Konstrukt Cbs1p Δ (1-29) in der Lage, die Nullmutante zu komplementieren. Das Wachstum der entsprechenden Transformante unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyps. Die UKB1-Transformanden hingegen, die ein Protein exprimieren, dem die ersten 76 N-terminalen As fehlen, sind nicht mehr zum Wachstum auf nicht-vergärbarem Substrat befähigt. Offensichtlich gehören die As 30-76 zu einem wichtigen Bereich des Proteins, der für den Import oder eine andere Funktion essentiell ist. Weitere N-terminale Verkürzungen um 82 As (Cbs1p Δ (1-82)) bzw. 96 As (Cbs1p Δ (1-96)) führen aus diesem Grund ebenfalls zum Ausfall des Wachstums der entsprechenden UKB1-Transformanden auf Glycerin-Ethanol-Medium (Abb. 19).

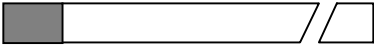
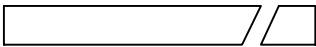
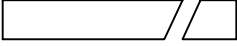
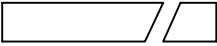
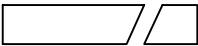
		Wachstum auf YPEG					
		multi-copy, <i>ADHI</i> Promotor			single-copy, <i>CBSI</i> Promotor		
		23°C	30°C	37°C	23°C	30°C	37°C
Cbs1p (wt)		+	++	+	+++	+++	+++
Cbs1p Δ (1-29)		+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cbs1p Δ (1-76)		-	-	-	-	-	-
Cbs1p Δ (1-82)		-	-	-	-	-	-
Cbs1p Δ (1-96)		-	-	-	-	-	-

Abb. 19: Komplementationsverhalten von N-terminal verkürztem Cbs1p in Abhängigkeit von der Expressionsstärke

Die entsprechenden UKB1-Transformanden, die die angegebenen Proteine authentisch exprimieren bzw. überexprimieren, wurden auf Glycerin-Ethanol-Medium (YPEG) überstempelt und das Wachstum bei 23°C, 30°C und 37°C getestet: „+++“ wt-entsprechendes, „++“ reduziertes, „+“ stark reduziertes bzw. „-“ kein Wachstum. Die entsprechend exprimierten Proteine sind schematisch dargestellt:

■=Präsequenz (As 1-29).

Die As 30-76 sind möglicherweise nicht ausschließlich für den Import notwendig

Um zu testen, ob die Komplementationsfähigkeit der N-terminal um mehr als 30 As trunkierten Cbs1p-Varianten durch Überexpression hergestellt werden kann, wurden die oben beschriebenen PCR-Fragmente der single-copy Vektoren unter

Verwendung der gleichen Schnittstellen in den Vektor p424ADH kloniert. Damit wird eine Überexpression von Cbs1p durch die hohe Kopienzahl des Vektors sowie den starken *ADH1* Promotor erreicht. Die erhaltenen Plasmide wurden in die Nullmutante UKB1 transformiert und das Wachstum der Transformanten auf Glycerin-Ethanol-Medium getestet. Aus Abb. 19 wird deutlich, dass Cbs1p-Derivate, denen N-terminal mehr als 76 As fehlen (Cbs1p Δ (1-76); Cbs1p Δ (1-82); Cbs1p Δ (1-96)), auch bei dieser Überexpression nicht in der Lage sind, den Ausfall von Cbs1p in der Nullmutante UKB1 zu restaurieren.

Wird Cbs1p ohne Präsequenz (Cbs1p Δ (1-29)) in der Nullmutante überexprimiert, so resultiert dies in einem dem Wildtyp vergleichbaren Wachstum auf nicht-vergärbarem Medium.

Bei einigen kernkodierten mitochondrialen Proteinen kann der Verlust der für den Import essentiellen Leadersequenz durch Überexpression kompensiert werden (Dircks and Poyton, 1990). Möglicherweise gelangt auch Cbs1p Δ (1-76) durch die Überexpression in die Mitochondrien. Unter dieser Annahme lässt sich vermuten, dass die As 30-76 (zusätzlich) eine vom Import verschiedene Funktion besitzen.

Die Überexpression des Wildtyp-Proteins interferiert mit der Funktionalität des Proteins

Bemerkenswerterweise führt die Überexpression des Wildtyp-Proteins bei 30°C zu einem reduzierten bzw. bei 23°C und 37°C zu einem stark reduzierten Wachstum der Nullmutante auf YPEG-Medium (Abb. 19). Offensichtlich beinhaltet die Cbs1p Präsequenz (As 1-29) Informationen, die sich unter den Bedingungen der Überexpression negativ auf die Funktion des Gesamtproteins auswirken.

3.3.2.4 Immunochemische Untersuchung zu internen Cbs1p-Importsignalen

Aus den Ergebnissen der Mutagenese des Cbs1p N-Terminus (s. 3.3.2.3) geht hervor, dass die abspaltbare Präsequenz (As 1-29) nicht notwendig für den mitochondrialen Import und für die korrekte Lokalisierung ist. Aus diesem Grund muss wenigstens ein weiteres (internes) Importsignal postuliert werden.

Grundlage der folgenden Analysen ist die Beobachtung, dass ein Gal4pBD::Cbs1p(30-233)-Fusionsprotein in der Lage ist, die Nullmutante zu komplementieren (s. 3.4.1). Als Reporterprotein für diese Untersuchungen wurde aus diesem Grund die Bindedomäne von Gal4p verwendet, an welche C-terminal Cbs1p(30-233); Cbs1p(30-146) bzw. Cbs1p(147-233) fusioniert wurde.

Zunächst wurde gezeigt, dass Gal4pBD allein nicht in die Mitochondrien importiert wird (Abb. 20). Die korrespondierende Bande konnte - auch bei längerer Exposition des Filmes - nicht in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Der Hauptteil des Proteins befindet sich im Kernkompartiment (s. Abb. 24). Dieser Befund schließt zum einen aus, dass die As 1-147 von Gal4p (Gal4pBD) ein mitochondriales Importsignal beinhalten, und zum anderen, dass die Überexpression des Proteins alleine nicht hinreichend für eine mitochondriale Lokalisierung ist.

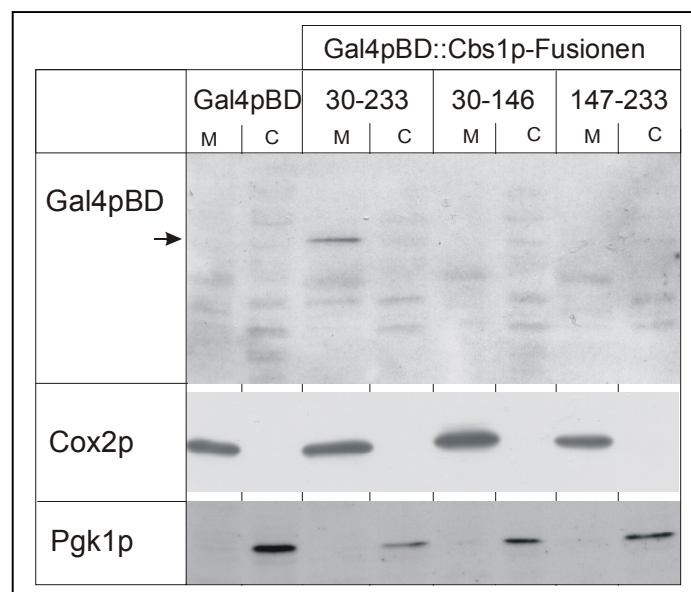


Abb. 20: Lokalisierung von Gal4pBD und Gal4pBD-Fusionen mit unterschiedlichen Proteinanteilen von Cbs1p

Mitochondrien aus Zellen, welche die Gal4p-Bindedomäne (Gal4pBD) bzw. die Gal4pBD-Fusionsproteine mit den angegebenen As von Cbs1p exprimieren, wurden isoliert und die Proteine (100 µg) der mitochondrialen (M) bzw. cytosolischen (C) Fraktion einer Western-Analyse unterzogen. Die Fusionsproteine wurden mit Antikörpern gegen Gal4pBD (oben) detektiert. Die Fraktionierung wurde mit Antikörpern gegen mitochondriales Cox2p (Mitte) bzw. cytosolisch lokalisiertes Pgk1p (unten) verifiziert.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass der fehlende Nachweis von Gal4pBD in Lysaten von Mitochondrien auf die Instabilität des Proteins im mitochondrialen Kompartiment zurückzuführen ist. Gal4pBD lässt sich nicht in der cytosolischen Fraktion nachweisen, wohl aber in der Kern-Fraktion (Abb. 24). Die Konzentration des Proteins im Cytosol ist nicht hinreichend, um im verwendeten immunologischen Nachweissystem detektiert zu werden. Möglicherweise wird es effizient in das Kernkompartiment transportiert (vgl. 3.4.4) oder im Cytosol proteolytisch degradiert.

Des weiteren konnte gezeigt werden (Abb. 20), dass Gal4pBD::Cbs1p(30-233) ohne nachweisbare Prozessierung in die Mitochondrien importiert wird. Das Fusionskonstrukt Gal4pBD::Cbs1p(30-233) konnte im erwarteten Molekulargewichtsbereich (42000) nachgewiesen werden. Aus den genannten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass sich innerhalb der As 30-233 von Cbs1p ein mitochondriales Importsignal befindet.

Um diesem Verdacht nachzugehen, wurden Mitochondrien aus Zellen isoliert, die Gal4pBD::Cbs1p(30-146) bzw. Gal4pBD::Cbs1p(147-233) exprimierten, und immunologisch charakterisiert.

Interessanterweise lässt sich weder die Gal4pBD-Fusion mit dem N-terminalen Anteil (As 30-146) noch die mit dem C-terminalen Segment (As 147-233) von Cbs1p in den mitochondrialen Fraktion nachweisen (Abb. 20). Wie schon für Gal4pBD beschrieben (s. oben), können die Proteinchimären zwar in der Kern-Fraktion detektiert werden (Abb. 24), aber ein Nachweis im Cytosol ist aus den oben angeführten Gründen auch hier nicht möglich.

Da weder die N-terminalen As 30-146 noch die sich nahtlos anschließenden As 147-233 von Cbs1p in der Lage sind, eine mitochondriale Lokalisierung von Gal4pBD zu vermitteln, lässt sich vermuten, dass es sich entweder um eine zwei- oder mehrteilige Signalsequenz handelt oder diese durch die willkürliche Teilung des Proteins betroffen ist, letztere entweder durch die Zerstörung der Signalsequenz *per se* oder indirekt durch Beeinflussung der Proteinfaltung. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteinchimären proteolytisch abgebaut werden und deswegen nicht nachweisbar sind.

3.4 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Two Hybrid-System

Das für diese Arbeit verwendete Two Hybrid-System (Fields and Song, 1989) basiert auf dem dualen Domänenaufbau des Transkriptionsaktivators Gal4p von *S. cerevisiae*. Beide Domänen, Aktivator- und DNA-Bindedomäne, sind unabhängig und getrennt voneinander funktionell, können aber nur in gemeinsamer räumlicher Nähe die Expression eines nachgeschalteten Genes aktivieren. Werden beide Domänen in Hefezellen getrennt exprimiert, kann diese räumliche Nähe durch Proteine, die an die Aktivator-domäne (Gal4pAD) bzw. DNA-Bindedomäne (Gal4pBD) fusioniert wurden, hergestellt werden, wenn diese physikalisch miteinander interagieren. Durch eine Interaktion der Fusionspartner sind die Kriterien erfüllt, um die Transkription eines Reportergens (*lacZ*, *HIS3*), das 5'-seitig die entsprechenden DNA-Sequenzen zur Bindung der DNA-Bindedomäne besitzt, zu aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System eingesetzt, um Interaktionspartner von Cbs1p und Cbs2p zu identifizieren. Neben dem Screening von Two Hybrid-cDNA-Banken stand die Untersuchung von potentiellen Interaktionspartnern im Direkttest gegen Cbs1p bzw. Cbs2p im Vordergrund. Die potentiellen Interaktionskandidaten, wie beispielsweise Proteine der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit oder Untereinheiten des Komplexes III der Atmungskette, wurden aus dem funktionellen Umfeld der beiden Translationsaktivatoren Cbs1p und Cbs2p ausgewählt. Abschließend wurden alle für das Two Hybrid-System klonierten Fusionen mit der Gal4p-Binde- bzw. Aktivator-domäne untereinander auf mögliche Interaktionen getestet.

3.4.1 Klonierungen für das Two Hybrid-System

Die Fusionen mit der Gal4p-Binde- bzw. Aktivator-domäne wurden wie beschrieben (s. 2.2.2.14.2) in die Vektoren pODB8/80 (Gal4pBD-Fusionen) und pACT2 (Gal4pAD-Fusionen) kloniert. Um Interferenzen mit der Kernlokalisation und/oder Faltung zu vermeiden, wurden die Fusionen - soweit bekannt - ohne die N-terminalen Präsequenzen konstruiert.

Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft und sind in Tab. 3a und 3b (Material und Methoden) zusammengefasst aufgelistet.

Im weiteren soll die Auswahl der Two Hybrid-Fusionen mit Cbs1p und Cbs2p näher erläutert werden. Cbs1p wurde ohne die abspaltbare Präsequenz (As 1-29) fusioniert (Abb. 20). Für Cbs2p konnte keine abspaltbare Präsequenz nachgewiesen werden (Michaelis and Rödel, 1990). Da die mitochondriale Target-Information häufig N-terminal lokalisiert ist, wurde im Fall von Cbs2p neben dem kompletten Leserahmen (As 1-389) zusätzlich ein um 14 As N-terminal verkürzter Leserahmen (Met(15)-389) für die Fusionen verwendet.

Ein Problem bei der Verwendung des Two Hybrid-Systems stellen oft Membranproteine dar (van Crielinge and Beyaert, 1999). Möglicherweise blockieren stark hydrophobe Bereiche die Passage durch die Kernmembran, behindern die native Faltung des Proteins in der Kernmatrix oder führen zur Aggregation des Proteins.

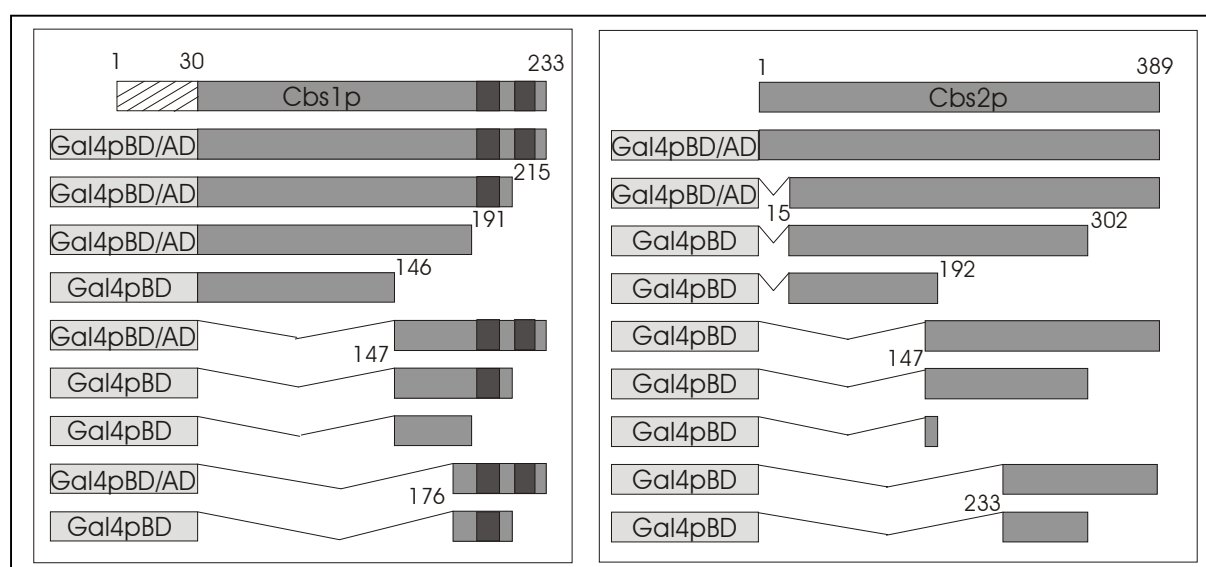


Abb. 21: Schematische Darstellung der verwendeten Two Hybrid-Fusionsproteine mit Cbs1p bzw. Cbs2p

In der jeweils oberen Reihe sind die wt-Proteine Cbs1p (links) bzw. Cbs2p (rechts) mit wichtigen Proteinbereichen (schraffiert: Präsequenz; dunkelgrau: hydrophobe Segmente) schematisch dargestellt. Die von Cbs1p bzw. Cbs2p abgeleiteten Proteinbereiche sind mittelgrau dargestellt. Der Gal4pBD- bzw. Gal4pAD-Anteil der Fusionsproteine ist hellgrau unterlegt. Deletierte interne Bereiche sind durch V-förmige Linien markiert. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an.

Cbs1p verfügt am C-Terminus über 2 Cluster nennenswerter Hydrophobizität (s. 3.2.1.2), die in 3 weiteren Two Hybrid-Konstrukten einzeln bzw. zusammen aus den vorher genannten Gründen ausgelassen wurden (Tab. 3a und Abb. 21).

Da keine Informationen über funktionelle Domänen der beiden Proteine bekannt waren, wurden unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur-Vorhersagen (vgl. 3.2.1.1) zusätzlich einzelne Segmente der Proteine mit den Gal4p-Domänen fusioniert.

Diese Auswahl einzelner Proteinsegmente (Abb. 21) soll die Lokalisierung von Bereichen, die verantwortlich für die Protein-Protein-Interaktion sind, ermöglichen bzw. auch die Spezifität einer potentiellen Interaktion belegen.

Die Fusionsproteine von Cbs1p(30-233) und Cbs2p(1-389) mit Gal4pBD sind funktionell

Werden die Vektoren pODB80 Cbs1p(30-233) und pODB80 Cbs2p(1-389) in die entsprechenden Nullmutanten GDVO ($\Delta cbs1$) bzw. UM1 ($\Delta cbs2$) transformiert, so sind diese Stämme wieder in der Lage, auf Medien mit nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Der Atmungsdefekt der Nullmutanten kann offensichtlich durch die jeweiligen Proteinchimären mit der DNA-Bindedomäne von Gal4p komplementiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass trotz der N-terminalen Fusionen die Funktion von Cbs1p bzw. Cbs2p aufrecht erhalten werden kann. Für das Konstrukt Gal4pBD::Cbs1p(30-233) konnte nachgewiesen werden, dass das gesamte Fusionsprotein ohne proteolytische Spaltung in die Mitochondrien importiert wird (s. 3.3.2.4, Abb. 20).

3.4.2 Nachweis der Expression der Cbs1p- bzw. Cbs2p-Gal4pBD-Fusionsproteine im Two Hybrid-Stamm Y187

Für den Nachweis der Expression der Fusionsproteine wurden Zell-Lysate der einzelnen Proben wie beschrieben hergestellt (s. 2.2.3.2) und einer Western-Analyse unterzogen (Abb. 22).

Alle Fusionsproteine mit Cbs1p und dessen Varianten konnten im erwarteten Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden (Abb. 22A). Die Expressionsstärke der einzelnen Fusionen ist bis auf eine Ausnahme (Gal4pBD::Cbs1p(176-215)) annähernd gleich. Auch für die Cbs2p-abgeleiteten Two Hybrid-Konstrukte konnten die korrespondierenden Banden im erwarteten Größenbereich detektiert werden (Abb. 22B). Bei Fusionen mit N-terminal um 14 As verkürztem Cbs2p (Gal4pBD::Cbs2p(15-192 bzw. 15-302)) konnte ein Signal im erwarteten Molekulargewichtsbereich erst nach längerer Exposition detektiert werden.

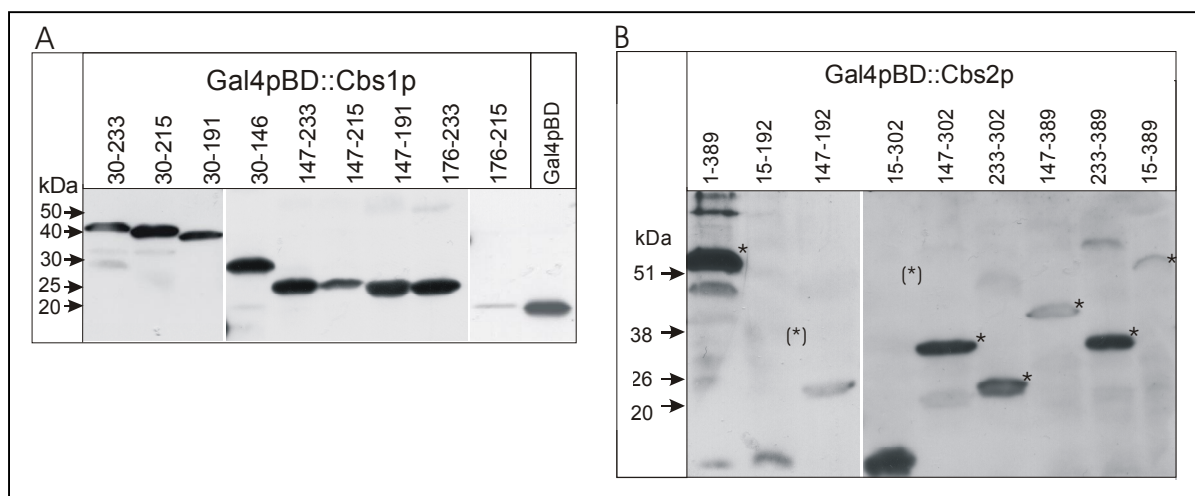


Abb. 22: Nachweis der Expression der Gal4pBD-Fusionen mit Cbs1p (A) bzw. Cbs2p (B) und deren Derivate

Proteine aus Zellen, die die angegebenen Fusionsproteine exprimieren, wurden extrahiert und gleiche Proteinmengen für die Western-Analyse eingesetzt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Gal4pBD-Antikörpern. Die jeweiligen As von Cbs1p bzw. Cbs2p, die fusioniert wurden, sind angegeben. (B) Die korrespondierenden Banden sind - falls erforderlich - mit einem Stern gekennzeichnet. (*) = erwartetes Molekulargewicht.

Auffallend sind bei diesen Konstrukten die Signale im unteren Molekulargewichtsbereich (Abb. 22), die vermutlich Abbauprodukte repräsentieren. Somit sind die Proteinchimären mit N-terminal um 14 As verkürztem Cbs2p nur bedingt für das Two Hybrid-System verwendbar, da sich auch das Fusionskonstrukt Gal4pBD::Cbs2p(15-389) nur schwach nachweisen lässt.

3.4.3 Nachweis der Expression der Fusionsproteine mit der Gal4p-Aktivator-domäne im Two Hybrid-Stamm HF7c

Die in Tab. 3a und 3b (Material und Methoden) aufgeführten Gal4pAD-Fusionen im Vektor pACT2 wurden in den Stamm HF7c transformiert und die Expression in Gesamtzell-Lysaten mittels Antikörpern gegen Gal4pAD nachgewiesen (Abb. 23).

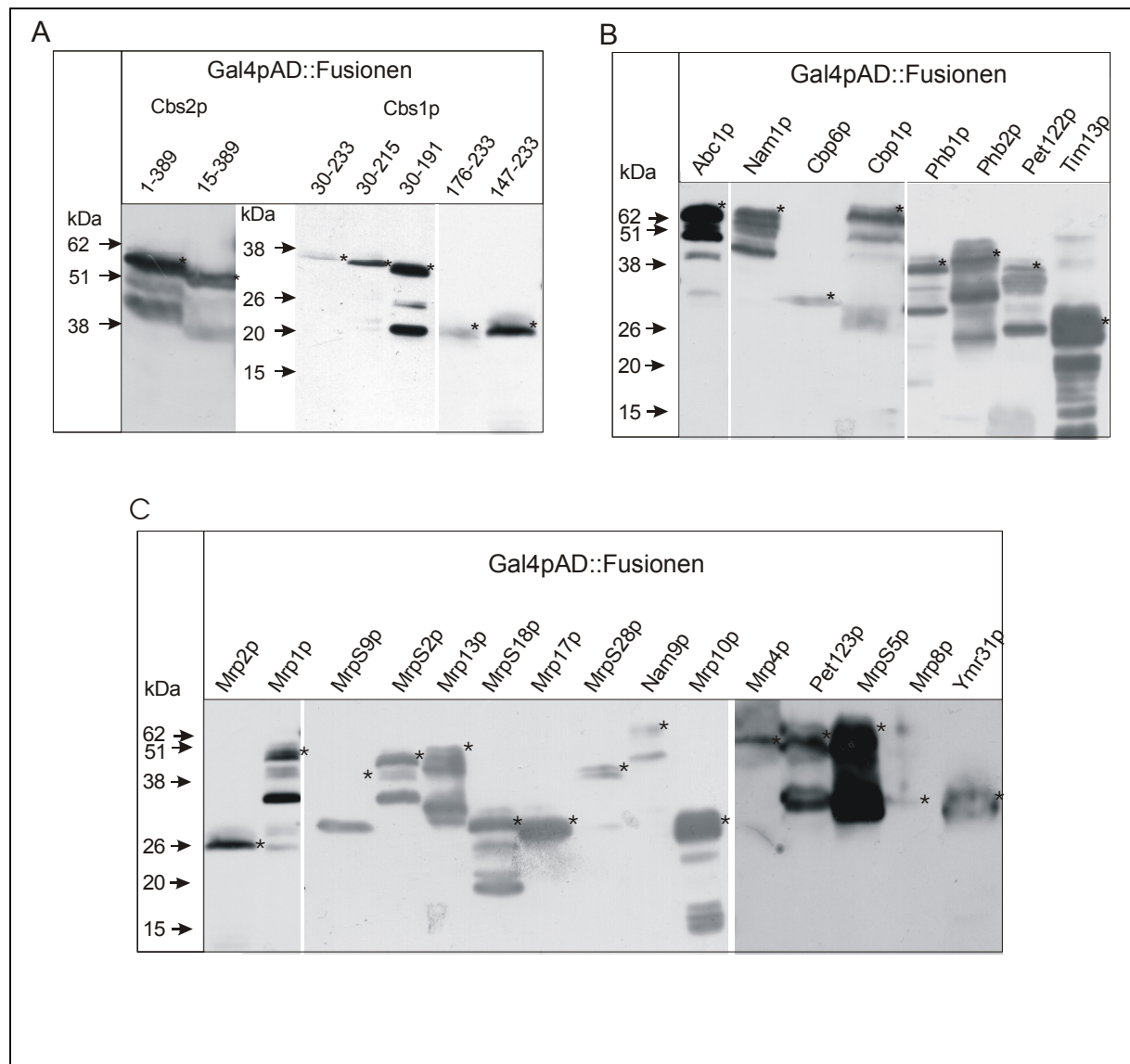


Abb. 23: Nachweis der Expression von Gal4pAD-Fusionsproteinen im Stamm HF7c

Die angegebenen Gal4pAD-Fusionsproteine mit Cbs1p und Cbs2p (A), mit weiteren potentiellen Interaktionskandidaten (B) bzw. mit Proteinen der kleinen mitochondrialen Untereinheit (C) wurden im Hefestamm HF7c exprimiert. Die Western-Analyse erfolgte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus dem entsprechenden Gesamtzell-Lysat. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die mit einem Stern markierten Banden besitzen das erwartete Molekulargewicht.

Im Vergleich zur Expressionsanalyse im Stamm Y187 (s. 3.4.2) unterliegen die Fusionsproteine im Stamm HF7c generell einer höheren Degradation. Da die Bedingungen für die Extraktion der Proteine identisch waren, ist die erhöhte Abbaurate offensichtlich stammspezifisch oder wird durch die Fusion mit Gal4pAD vermittelt.

Sowohl für die Gal4pAD-Fusionsproteine mit Cbs1p und Cbs2p (Abb. 23A) als auch mit Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit (Abb. 23C) und weiteren Fusionspartnern (Abb. 23B) konnten die entsprechenden Signale im erwarteten Molekulargewichtsbereich - bis auf eine Ausnahme (MrpS9p) - nachgewiesen werden. Die angegebenen Konstrukte wurden daher für die weiteren Analysen mit dem Two Hybrid-System verwendet.

Eine Ausnahme bildet die Gal4pAD-Fusion mit MrpS9p, wobei die apparente molare Masse im SDS-Gel ca. 10 kDa unterhalb des rechnerisch ermittelten Wertes liegt. Durch DNA-Sequenzierung konnte ein vorzeitiges Stopp-Codon als Ursache ausgeschlossen werden. Somit besitzt das Protein möglicherweise ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel, wie es beispielsweise auch für Cbp1p beschrieben wurde (Weber and Dieckmann, 1990). Andererseits ist denkbar, dass die sichtbare Bande ein stabiles Abbauprodukt repräsentiert und das Protein in gesamter Länge nicht mehr nachweisbar ist. Da auf DNA-Ebene keine Mutation detektiert werden konnte, wurde auch dieses Konstrukt für weitere Two Hybrid-Experimente eingesetzt.

3.4.4 Nachweis der Kernlokalisierung von Gal4pBD::Cbs1p-Fusionsproteinen

Eine essentielle Voraussetzung für die Funktionsweise des Two Hybrid-Systems ist die Kernlokalisierung beider Fusionspartner. Bei Fusionen mit mitochondrialen Proteinen besteht zumindest theoretisch die Möglichkeit, dass deren Target-Signale mit denen für die Kernlokalisierung, die sich am N-Terminus von Gal4pBD (authentisches Kernlokalisierungssignal) bzw. von Gal4pAD (SV40 „large T antigen“-Kernlokalisierungssignal) befinden, interferieren. Dass zumindest ein Teil in die Mitochondrien importiert werden kann, belegt die funktionelle Komplementation der mit Gal4pBD::Cbs1p(30-233) transformierten Nullmutante (s. 3.4.1) bzw. der immunologische Nachweis des unprozessierten Fusionsproteins in der mitochondrialen Fraktion (Abb. 20).

Um die Kernlokalisierung am Beispiel von Cbs1p-Fusionen nachzuweisen, wurden Kerne von Zellen, die Gal4pBD::Cbs1p(30-233), ::Cbs1p(30-191) bzw. ::Cbs1p(147-233) exprimieren, isoliert und im Percoll-Gradienten aufgereinigt (s. 2.2.3.1.3).

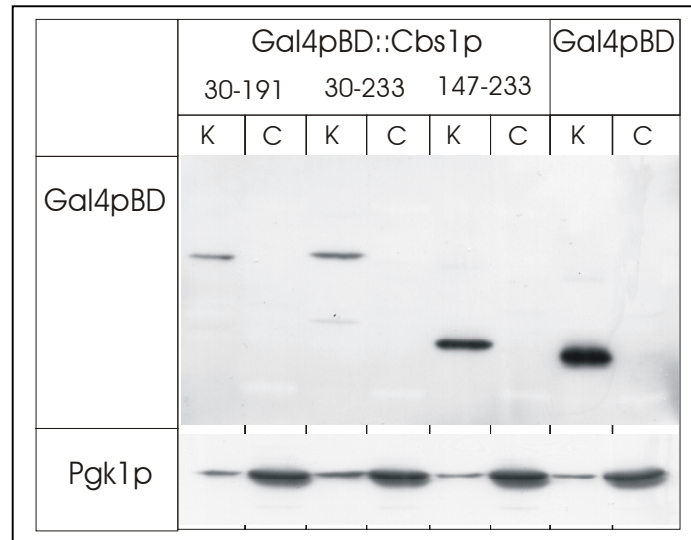


Abb. 24: **Nachweis der Kernlokalisierung von Gal4pBD-Fusionen**

Gal4pBD bzw. Gal4pBD-Fusionsproteine mit den angegebenen As von Cbs1p wurden im Stamm Y187 exprimiert und die Kerne präpariert. Je 50 µg Protein wurden aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum Nachweis der Identität der Kern (K)- und der cytosolischen (C) Fraktion wurden Gal4pBD (besitzt authentisches Kernlokalisierungssignal) und das cytosolische Protein Pgk1p immunologisch detektiert.

Jeweils 50 µg Protein der Kern- bzw. cytosolischen Fraktion wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung einer Western-Analyse unterzogen.

Wie aus Abb. 24 hervorgeht, konnte Gal4pBD fast ausschließlich in der Kern-Fraktion nachgewiesen werden. Da die As 1-147 von Gal4p (Gal4pBD) das authentische Kernlokalisierungssignal tragen, konnte damit die Identität der Kern-Fraktion belegt werden. Pgk1p, ein Protein des Cytosols, wurde erwartungsgemäß zum überwiegenden Teil in der cytosolischen Fraktion detektiert. Ein geringer Anteil von Pgk1p wurde auch in der Kern-Fraktion nachgewiesen und zeigt eine geringfügige cytosolische Kontamination an.

Die verschiedenen Fusionen von Gal4pBD mit Cbs1p-Derivaten lassen sich ebenfalls fast ausschließlich in der Kern-Fraktion nachweisen (Abb. 24). Somit konnte für diese Proteinchimären die Kernlokalisierung belegt werden.

Weiterhin konnten keine Abbauprodukte nachgewiesen werden, die in auffälligen Konzentrationen akkumulieren. Dies impliziert, dass die chimären Proteine stabil im Zellkern vorliegen.

Beide Kriterien - Stabilität und Kernlokalisation der Proteine - sind als essentielle Voraussetzungen für die Funktionsweise des Two Hybrid-Systems im Fall der Cbs1p-abgeleiteten Gal4pBD-Fusionen erfüllt.

3.4.5 Interaktionsanalyse mittels cDNA-Bankscreening

3.4.5.1 Herstellung einer Two Hybrid-cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde, wie unter 2.2.2.14.1 beschrieben, hergestellt. Für die Isolation der mRNA wurde der *S. cerevisiae*-Stamm Y190 ($\Delta gal4$ und $\Delta gal80$) ausgewählt. Da viele Gene, deren Produkte an der Zellatmung beteiligt sind, durch Glucose und/oder anaerobes Wachstum reprimiert werden (s. Einleitung), wurden die Zellen unter dereprimierenden, aeroben Bedingungen propagiert (YP+Glycerin). Die Isolation der mRNA und die Synthese der cDNA erfolgte wie beschrieben (s. 2.2.2.14.1). Nach der Ligation der synthetisierten cDNA mit dem Vektor pGAD10 (ClonTech) und Transformation in *E. coli* wurden ca. 2×10^4 unabhängige Ampicillin-resistente Klone erhalten. Für eine repräsentative cDNA-Bank für *S. cerevisiae* sind ca. 10^6 unabhängige Klone notwendig, um sicherzustellen, dass auch Transkripte mit geringer Abundanz vertreten sind. Ursache für die geringe Komplexität der hergestellten Bank ist der vom Hersteller zur Klonierung der Bank mitgelieferte, bereits mit *EcoRI* geschnittene Vektor, der, wie sich später durch Sequenzierung zeigte, nicht über diese *EcoRI*-Schnittstelle verfügte. Dadurch wurden bei der Ligation nur cDNA-Fragmente einkloniert, die (noch) mit „blunt“-Enden versehen waren.

Da die Bank ausgehend von Zellen konstruiert wurde, die unter ausgewählten Bedingungen (s. oben) entsprechend der Fragestellung propagiert wurden, kann angenommen werden, dass die Transkriptmenge der für die mitochondriale Biogenese relevanter mRNAs anteilig höher liegt.

Aus diesem Grund wurde diese Bank dennoch für das Screening nach Interaktionspartnern für Cbs1p bzw. Cbs2p verwendet.

3.4.5.2 Two Hybrid-Bankscreening nach Cbs1p- bzw. Cbs2p-Interaktionspartnern

Neben der konstruierten cDNA-Bank (s. 3.4.5.1) wurde ebenfalls eine weitere Two Hybrid-cDNA-Bank von *S. cerevisiae* (EuroFan; erhalten von T. Munder, Jena) verwendet. Um auch in phylogenetisch entfernten Organismen nach interagierenden homologen Proteinen zu suchen, wurde zusätzlich eine *S. pombe* Matchmaker Two Hybrid-cDNA-Bank (ClonTech) zum Screening eingesetzt.

Als Köderprotein („bait“) wurden die Fusionen Gal4pBD::Cbs1p(30-233) bzw. Gal4pBD::Cbs2p(1-389) im Vektor pODB80 eingesetzt. Für das Screening wurde zum einen die cDNA-Bank in den Stamm HF7c transformiert, der bereits eines der beiden „bait“-Plasmide enthielt, und zum anderen wurden die „bait“-Plasmide im HF7c und die cDNA-Bank im Stamm Y187 durch Kreuzung (s. 2.2.1.2) zusammengebracht. Die Ansätze aus Transformation bzw. Kreuzung wurden zunächst zum Test der Aktivierung des *HIS3*-Reportergenens auf Selektivmedium ohne die As Leucin, Tryptophan (beide As für Plasmidselektion) und Histidin ausgestrichen. Ein Aliquot wurde zur Kontrolle der Effizienz von Transformation bzw. Kreuzung auf Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan ausgespatelt. Klone, die innerhalb von 10 Tagen aufwuchsen, wurden im β -Galaktosidase-Assay (s. 2.2.2.14.3, „colony-lift“-Filter-Assay; Inkubationszeit bis 48 h) untersucht. In Tab. 7 sind die Ergebnisse der Bank-Screening-Experimente zusammengefasst.

Beim Screening der konstruierten Bank mit Cbs1p bzw. Cbs2p wurden 5 Klone identifiziert, die nach längerer Inkubation im β -Galaktosidase-Assay eine Blaufärbung zeigten. Von diesen beinhalten 4 Klone Inserts in inverser Orientierung, d.h., an die Gal4pAD wurde der polyA-Schwanz (als polyT) fusioniert. Offensichtlich vermittelt die daraus resultierende Zufallsfusion von 8 aufeinanderfolgenden Phenylalanin-Resten (Codon UUU) eine geringe Aktivierung der Reportergene. Dass auch Inserts in dieser Orientierung vorhanden sind, ist auf den defekten Klonierungsvektor (s. 3.4.5.1) zurückzuführen.

Ein weiterer Klon enthält ein Insert, das den Leserahmen von Gal4pAD bereits 3 As nach der Fusionsstelle abbrechen lässt. Warum dieses Insert zur Aktivierung der Reportergene führt, ist unklar. Auch beim Screening der zweiten *S. cerevisiae*-Bank (EuroFan) konnten nur „falsch positive“ Interaktionspartner isoliert werden, die zu der bereits charakterisierten Gruppe (s. oben) von Inserts gehören (Tab. 7).

Interaktionspartner „bait“	cDNA-Bank	getestete Klone	His ⁺ -Klone	<i>lacZ</i> ⁺ -Klone	Insert				
					cDNA invers	<i>Sphis</i> ⁺	cyt. rib. Protein	Zufallspeptid	andere
Cbs1p	konstruiert	1,4x10 ⁶	14	1	1				
Cbs1p	<i>S. cerevisiae</i>	2,3x10 ⁷	34	3				3	
Cbs1p	<i>S. pombe</i>	1,2x10 ⁵	60	4		2	1	1	
Cbs2p	konstruiert	4,2x10 ⁶	38	4	3			1	
Cbs2p	<i>S. cerevisiae</i>	3,2x10 ⁶	45	5				5	
Cbs2p	<i>S. pombe</i>	7,5x10 ⁵	56	13		3	5		5

Tab. 7: **Ergebnisse des Screenings nach Cbs1p- bzw. Cbs2p-Interaktionspartnern mit Two Hybrid-cDNA-Banken**

Die verwendeten cDNA-Banken mit der Anzahl der getesteten Klone sowie der Klone, die zur Aktivierung der Reportergene (*HIS3* bzw. *lacZ*) in der Lage waren, sind angegeben. Die isolierten und identifizierten Inserts der His⁺- und *lacZ*⁺-Klone wurden in Gruppen zusammengefasst.

Die hohe Anzahl an His⁺-Klonen beim Einsatz der *S. pombe*-Bank ist auf die Komplementation von *his3* durch *Sphis*⁺ zurückzuführen. Auch im β -Galaktosidase-Assay zeigten einige Klone, die *Sphis*⁺ als Insert enthielten, nach ca. 48 h eine leichte Blaufärbung. Eine weitere Gruppe von Inserts, die zur Aktivierung von *lacZ* führten, sind cytoplasmatische ribosomale Proteine, die zum Teil nicht „in frame“ zum Leserahmen von Gal4pAD fusioniert sind. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass „frame-shifts“ (+1 und -1 „shifts“) zwischen den Fusionspartnern offensichtlich korrigiert werden können (Fromont-Racine *et al.*, 1997), sodass

dennoch ein korrektes Fusionsprotein gebildet wird. Ribosomale Proteine werden oft als sogenannte „falsch Positive“ gefunden (Hengen, 1997). Die hier identifizierten cytoplasmatischen ribosomalen Proteine besitzen - bis auf eine Ausnahme - keine Homologie zu mitochondrialen ribosomalen Proteinen in *S. cerevisiae*. Somit ist es unwahrscheinlich, dass diese Interaktionen physiologische Bedeutung im Cbs1p- bzw. Cbs2p-Kontext besitzen. Ein 60S-ribosomales Protein aus *S. pombe* (SpRpl16ap) besitzt neben der Homologie zum cytoplasmatischen ribosomalen Protein in *S. cerevisiae* ebenfalls Homologie zu einem mitochondrialen Protein der großen ribosomalen Untereinheit - MrpL23p. Der Leserahmen von *MRPL23* wurde an die *GAL4AD* bzw. *-BD* fusioniert und mit den entsprechenden Cbs1p- und Cbs2p-Konstrukten direkt im Two Hybrid-System getestet. Die Interaktion von Cbs1p bzw. von Cbs2p mit MrpL23p in *S. cerevisiae* konnte nicht bestätigt werden.

Letztlich wurden Inserts identifiziert, die aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation und Funktion offensichtlich nicht in Verbindung mit der Funktion von Cbs2p stehen. Dazu gehören die Leserahmen (*S. cerevisiae*-Homologe) der cytoplasmatischen Proteine Met6p (Homocystein-Methyltransferase), Tdh1p (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und des mikrosomalen Proteins Ole1p (Stearoyl-CoA Desaturase). Als weiteres Protein wurde das *S. cerevisiae*-Homologe Cpr3p (Cyclophilin) identifiziert, dass an der Faltung mitochondrialer Proteine beteiligt ist. Zwar kann eine temporäre Interaktion mit Cbs2p nicht ausgeschlossen werden, aber für die Funktion des maturen Proteins spielt Cpr3p vermutlich keine Rolle. Auch die ORFs dieser Proteine befanden sich teilweise nicht „in frame“.

Des weiteren wurde beim Screening der *S. pombe*-Bank mit Gal4pBD::Cbs2p aus einem Histidin-prototrophen, *lacZ*-positiven Klon ein Plasmid isoliert, welches den kompletten Leserahmen *SpYDF9* als Insert trägt. Da auch 5'-seitige, nicht-kodierende Sequenzen dieses ORFs vorhanden sind, befindet sich zwischen *GAL4AD* und Beginn des Leserahmens von *YDF9* ein Stopp-Codon. Möglicherweise kann das Stopp-Codon „überlesen“ werden, sodass die Transkriptionsaktivierung trotzdem auf die Interaktion von Gal4pBD::Cbs2p mit Gal4pAD::YDF9p zurückzuführen ist. SpYDF9p besitzt in *S. cerevisiae* Homologie zu Tim13p, einem kürzlich identifizierten Protein der mitochondrialen Translokationsmaschinerie (Leuenberger *et al.*, 1999).

Aufgrund der theoretischen Verbindung von Cbs2p und Tim13p und der Möglichkeit, dass das Stopp-Codon „überlesen“ werden könnte, wurde der homologe ORF aus *S. cerevisiae* im Rahmen der Interaktionsanalyse im Direkttest (s. 3.4.6.4) analysiert. Zwar konnte dabei die Aktivierung des *HIS3*-Reportergenese durch die Co-Expression von Gal4pBD::Cbs2p(233-389) und Gal4pAD::Tim13p gezeigt (Abb. 27), allerdings keine Expression der β -Galaktosidase nachgewiesen werden, die signifikant über der Negativkontrolle lag. Offensichtlich handelt es sich um eine *HIS3* Promotor spezifische Aktivierung. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass die *HIS3*-Aktivierung nur durch den C-terminalen Teil von Cbs2p, nicht aber durch das Gesamtprotein hervorgerufen wurde, muss geschlossen werden, dass die Interaktion von Cbs2p und Tim13p im Two Hybrid-System nicht bestätigt werden kann.

Somit konnten sowohl beim Screening der *S. cerevisiae*-Banken als auch der *S. pombe*-cDNA-Bank keine Proteine identifiziert werden, die mit Cbs1p bzw. Cbs2p spezifisch interagieren.

3.4.6 Interaktionsanalyse durch direkten Test potentieller Interaktionspartner

3.4.6.1 Etablierung eines „high-throughput“-Screeningsystems für Two Hybrid-Analysen

Der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion mit Hilfe des Two Hybrid-Systems beruht auf der Aktivierung der Transkription. Es ist daher denkbar, dass eine Reihe von Faktoren, wie beispielsweise der physiologische Zustand der Zelle, Auswirkungen auf dieses *in vivo*-Testsystem haben könnten. Möglicherweise hängt die Transkriptionsaktivierung infolge der physikalischen Interaktion der Gal4p-Chimären von einer Reihe weiterer (temporärer) Faktoren ab, die bei unabhängigen Experimenten nicht reproduzierbar sind. Aus Vorversuchen war bekannt, dass besonders bei schwacher Aktivierung des *lacZ*-Reportergenese Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auftraten.

Aus diesem Grund wurde ein Testsystem entwickelt, um die Analyse von Interaktionen eines Fusionsproteins mit einer großen Anzahl weiterer potentieller

Interaktionspartner unter weitestgehend vergleichbaren experimentellen Bedingungen zu ermöglichen. Dieses auf Mikrotiterplatten-Basis verwirklichte Testsystem erlaubt durch die Vielzahl an Kombinationen der Interaktionskandidaten den schnellen Ausschluss von Proteinen, die durch transaktivierende bzw. DNA-bindende Eigenschaften zur Aktivierung der Reportergene führen. Dieses Screeningsystem ist darüber hinaus geeignet, den Bereich eines Proteins zu identifizieren, der verantwortlich für eine Protein-Protein-Wechselwirkung ist. Das zu untersuchende Protein kann mit einer Reihe von trunkierten Proteinderivaten des putativen Partners kombiniert und simultan getestet werden.

Für die nachfolgenden Analysen wurden die Gal4pBD-Fusionen (Vektor pODB8/80) in den Stamm Y187 transformiert. Die Konstrukte mit Gal4pAD (Vektor pACT2) wurden in den Stamm HF7c transformiert. Als Negativkontrolle wurden die Insert-freien Vektoren pODB80 bzw. pACT2 in die entsprechenden Stämme transformiert. Das Plasmid pCL1 (kodiert für Gal4p, ClonTech) wurde als Positivkontrolle in den Stamm HF7c transformiert.

Bei der Verwendung von Insert-freiem pODB8 als Negativkontrolle trat eine geringe Aktivierung der Reportergene auf, die zu einem erhöhten Basallevel des Wachstums auf Histidin-freiem Medium bzw. der β -Galaktosidase-Aktivität führte. Wurde allerdings ein Insert einkloniert, so reduzierte sich das Basallevel der Reporter-gen-Aktivierung auf das Niveau der Negativkontrollen pODB80 bzw. pACT2 (β -Galaktosidase-Aktivität ca. 30 μ U/OD₆₀₀). Offensichtlich führt die Verlängerung des *GAL4BD*-Leserahmens in diesem Vektor durch die Codons des HA-tags und der „multiple cloning site“ zu einer geringen Aktivierung, die durch die Unterbrechung des ORFs infolge der Insert-Klonierung aufgehoben wird (vgl. Gal4pBD-Fusionen in Kombination mit Gal4pAD, Abb. 25-28). Dieses Phänomen wurde auch bei einer Reihe weiterer Two Hybrid-Vektoren beschrieben, die die kodierende Sequenz des HA-Epitops beinhalten (van Crielinge and Beyaert, 1999). Darüber hinaus beschreiben die Autoren auch die Beobachtung, dass (nur) bei „*in frame*“-Fusionen von Inserts in die „multiple cloning site“ dieser Vektoren die Aktivierung der Reportergene alleine durch Gal4pBD drastisch reduziert wird.

Die verschiedenen Two Hybrid-Konstrukte wurden durch Kreuzung der plasmidtragenden Stämme Y187 bzw. HF7c in Mikrotiterplatten kombiniert (s. 2.2.2.14.4).

Anschließend wurden zunächst je 10 µl der Kreuzungssuspension auf Minimalmediumplatten ohne die As Leucin und Tryptophan pipettiert, um die Diploidisierung und damit die Präsenz beider Two Hybrid-Plasmide zu bestätigen. Zum Nachweis der Aktivierung des Reportergenes *HIS3* wurden parallel je 10 µl der Kreuzungsansätze auf Minimalmediumplatten ohne die As Leucin, Tryptophan und Histidin pipettiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Kreuzungskombinationen, bei denen auf dem Selektivmedium ohne Histidin innerhalb von 7 Tagen ein Wachstum der Diploiden beobachtet werden konnte, wurden für den zweiten Reportergen-Assay (β -Galaktosidase-Test) ausgewählt.

Für den Chemolumineszens-Assay zum Nachweis der Aktivierung des *lacZ*-Reportergenes (s. 2.2.2.14.3) wurden Zellen der Histidin-prototrophen Klone in je 5 ml Selektivmedium ohne die As Leucin und Tryptophan \bar{u} N propagiert. Von diesen Zellsuspensionen (OD_{600} ca. 1,0 – 1,4) wurden jeweils 100 µl in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Lyse der Zellen und der Start der Chemolumineszens-Reaktion erfolgten simultan durch Zugabe von 100 µl GalScreen™-Lösung (Tropix). Die Chemolumineszens wurde nach 30 bzw. 60 min Inkubation bei 30°C gemessen (CPS, „counts per seconds“).

Bei diesem semi-quantitativen Assay bewegten sich die Messwerte für die Negativkontrollen (Mittelwert von 50 Proben) bei 400 ± 100 CPS (60 min Inkubation). Proben, bei denen sich der Messwert signifikant über dem ermittelten „background“ befand, wurden für einen quantitativen Enzym-Assay der β -Galaktosidase-Aktivität ausgewählt.

Für den quantitativen Enzym-Assay wurde jeweils in einem 3fach-Parallelansatz die Intensität der Chemolumineszens wie oben beschrieben (vgl. auch 2.2.2.14.3) ermittelt, die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase über eine Eichreihe mit gereinigtem Enzym (Boehringer, Mannheim) bestimmt und auf die eingesetzte Zelldichte (OD_{600}) normiert.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Interaktionskandidaten in einem unabhängigen Experiment durch Co-Transformation in den Stamm Y187 transformiert und die Aktivität der β -Galaktosidase im quantitativen Assay erneut bestimmt (s. oben).

3.4.6.2 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Cbs1p und Cbs2p

Cbs1p und Cbs2p sind funktionell an der Synthese des Apocytochrom *b* beteiligt. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass diese Proteine miteinander physikalisch wechselwirken könnten. Für die Translationsaktivatoren der COX3-mRNA (Pet122p, Pet54p und Pet494p) konnte beispielsweise bereits eine derartige Interaktion mit dem Two Hybrid-System gezeigt werden (Brown *et al.*, 1994).

Zunächst wurden die Cbs1p-Derivate bzw. Cbs2p-Derivate mit der Gal4pBD bzw. Gal4pAD und *vice versa* fusioniert (Abb. 21). Die entsprechenden Plasmidpaare (pODB80/pACT2) wurden, wie bereits beschrieben (s. 2.2.1.2), durch Kreuzung in die resultierenden Diploiden eingebracht. Der Test auf die Aktivierung des Reportergens *HIS3* wurde wie unter 3.4.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse des Reporter-gen-Assays sind in Abb. 25 dargestellt.

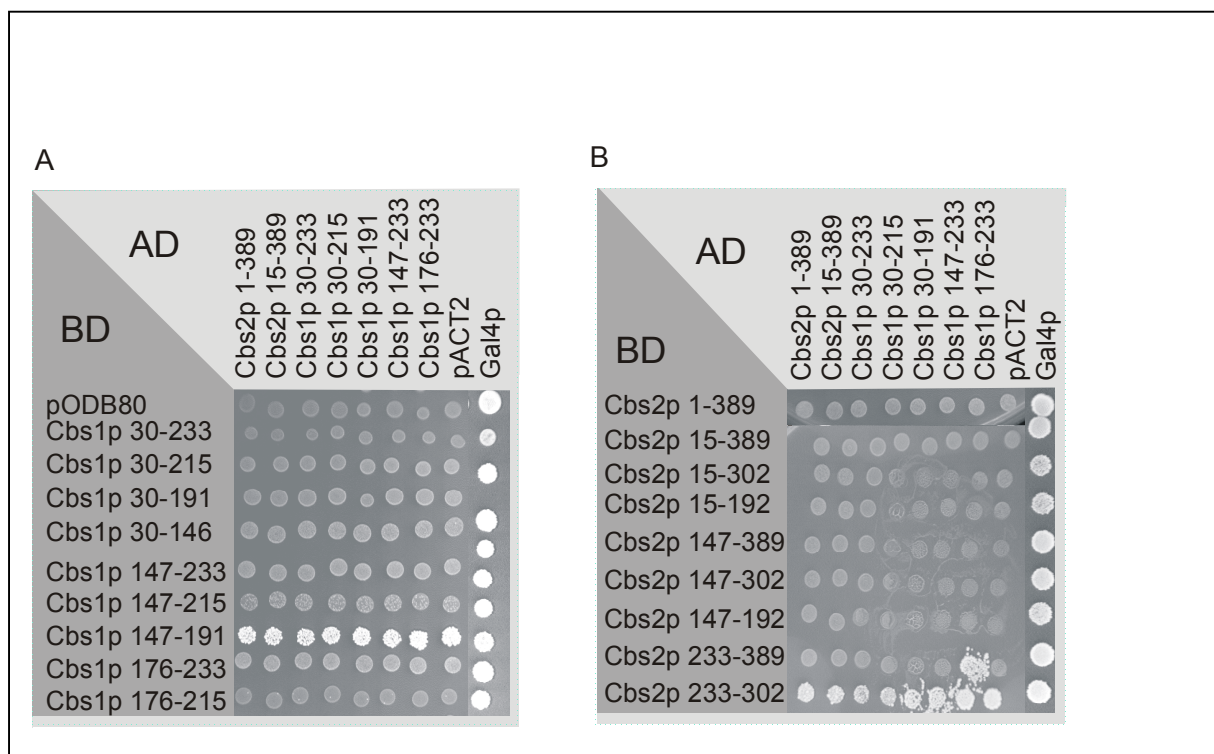


Abb. 25: Test auf Interaktion zwischen Cbs1p und Cbs2p

Dargestellt ist das Wachstum auf Selektivmedium ohne Histidin zur Kontrolle der Aktivierung des *HIS3*-Reportergens mit Cbs1p (A) bzw. Cbs2p (B) als Gal4pBD-Fusionspartner. Die entsprechenden co-exprimierten Fusionsproteine mit Gal4pBD (BD) bzw. Gal4pAD (AD) sind angegeben.

Die Expression von Gal4p führt erwartungsgemäß zum Wachstum auf Selektivmedium ohne Histidin. Zur Kontrolle einer möglichen transaktivierenden oder DNA-bindenden Fähigkeit der fusionierten Proteinanteile der Translationsaktivatoren wurden alle Gal4pBD-Fusionen mit dem Insert-freien Vektor pACT2 (kodiert für Gal4pAD) bzw. alle Gal4pAD-Fusionen mit dem Insert-freien Vektor pODB80 (kodiert für Gal4pBD) kombiniert. Aus dem Wachstum der zugehörigen Diploiden auf Selektivmedium kann geschlussfolgert werden, dass die Proteinsegmente Cbs1p(147-191) und Cbs2p(233-302) transaktivierende Eigenschaften besitzen müssen. Alle anderen Konstrukte führen nicht zur Aktivierung von *HIS3*. Somit stehen diese für die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen Cbs1p und Cbs2p zur Verfügung.

Wie aus Abb. 25 ersichtlich, kann nur bei der Co-Expression von Gal4pBD::Cbs2p(233-389) und Gal4pAD::Cbs1p(176-233) ein Wachstum der Diploiden verzeichnet werden. Der zugehörige Assay auf Aktivierung des zweiten Reportergenes (*lacZ*) fiel allerdings negativ aus. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei weiteren Kombinationen von Gal4pAD-Fusionen mit Gal4pBD::Cbs2p(233-389) erhalten (Abb. 25). Möglicherweise wirkt dieser Cbs2p-Anteil allein in bestimmten Konstellationen aktivierend auf die *HIS3*-Expression.

Alle anderen in Abb. 25 untersuchten Kombinationen führten nicht zur Reportergergen vermittelten Histidin-Prototrophie.

Da sich die Two Hybrid-Stämme in der Expressionsstärke der Reportergene unterscheiden, wurden die Plasmide zusätzlich in weitere Two Hybrid-Stämme (SFY526, Y190, CG-1945) co-transformiert und die Transformanden mittels „colony-lift“-Filter-Assay (s. 2.2.2.14.3) bzw. Selektivmedium ohne Histidin auf die Aktivierung der entsprechenden Reportergene untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche bestätigten die oben genannten Befunde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in keiner der getesteten Kombinationen der beiden Translationsaktivatoren Cbs1p bzw. Cbs2p als Gal4pAD- bzw. Gal4pBD-Fusion ein positiver Nachweis der Aktivierung beider Reportergene gefunden werden konnte. Somit konnte mit Hilfe des Two Hybrid-Systems weder eine

Heteromerisierung noch eine Homomerisierung von Cbs1p bzw. Cbs2p nachgewiesen werden.

3.4.6.3 Test der Interaktion von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit

Für Pet122p, einen Translationsaktivator der COX3-mRNA, konnten genetisch interagierende Proteine der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit, Mrp1p, Mrp17p und Pet123p, identifiziert werden (Haffter and Fox, 1992; Haffter *et al.*, 1991; McMullin *et al.*, 1990).

Auch für Cbs2p gibt es immunologische Hinweise auf eine Assoziation mit der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit (Michaelis, 1991).

Um zu testen, ob eine Interaktion zwischen den Translationsaktivatoren der COB-mRNA und Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit mit dem Two Hybrid-System nachweisbar ist, wurden alle bislang identifizierten Leserahmen von Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit (Kitakawa *et al.*, 1997; Mewes *et al.*, 1999) mit *GAL4AD* bzw. *GAL4BD* fusioniert. Soweit bekannt, wurden abspaltbare N-terminale Präsequenzen deletiert. Über die eingesetzten mito-ribosomalen Proteine und deren Klonierung gibt Tab. 3b (Material und Methoden) Auskunft.

Für das Screening wurden die Gal4pAD-Fusionen der mito-ribosomalen Proteine mit den bereits beschriebenen Cbs1p- bzw. Cbs2p-Gal4pBD-Konstrukten (s. 3.4.1) kombiniert. Die Interaktionsanalyse erfolgte wie beschrieben im Mikrotiterplatten-Assay, dessen Ergebnisse in Abb. 26 dargestellt sind.

Wie schon erwähnt (s. 3.4.6.2), führt die Expression von Gal4pBD::Cbs1p(147-191) bzw. Gal4pBD::Cbs2p(233-302) alleine bereits zur Aktivierung der *HIS3*-Transkription. Des weiteren konnte bei 3 Kreuzungsansätzen jeweils mit dem Gal4pBD::Cbs2p(233-389) als Interaktionspartner ein Wachstum auf dem Selektionsmedium verzeichnet werden. Demnach führten die Co-Expression von Gal4pBD::Cbs2p(233-389) und der Mrp4p-, MrpS28p- oder Pet123p-Fusion mit der Aktivator-domäne zur Histidin-Prototrophie. Allerdings konnte auch hierbei - wie bereits für andere Interaktionen mit diesem Cbs2p-Derivat beschrieben (s. 3.4.6.2) - keine Aktivierung des zweiten Reportergenes (*lacZ*) nachgewiesen werden.

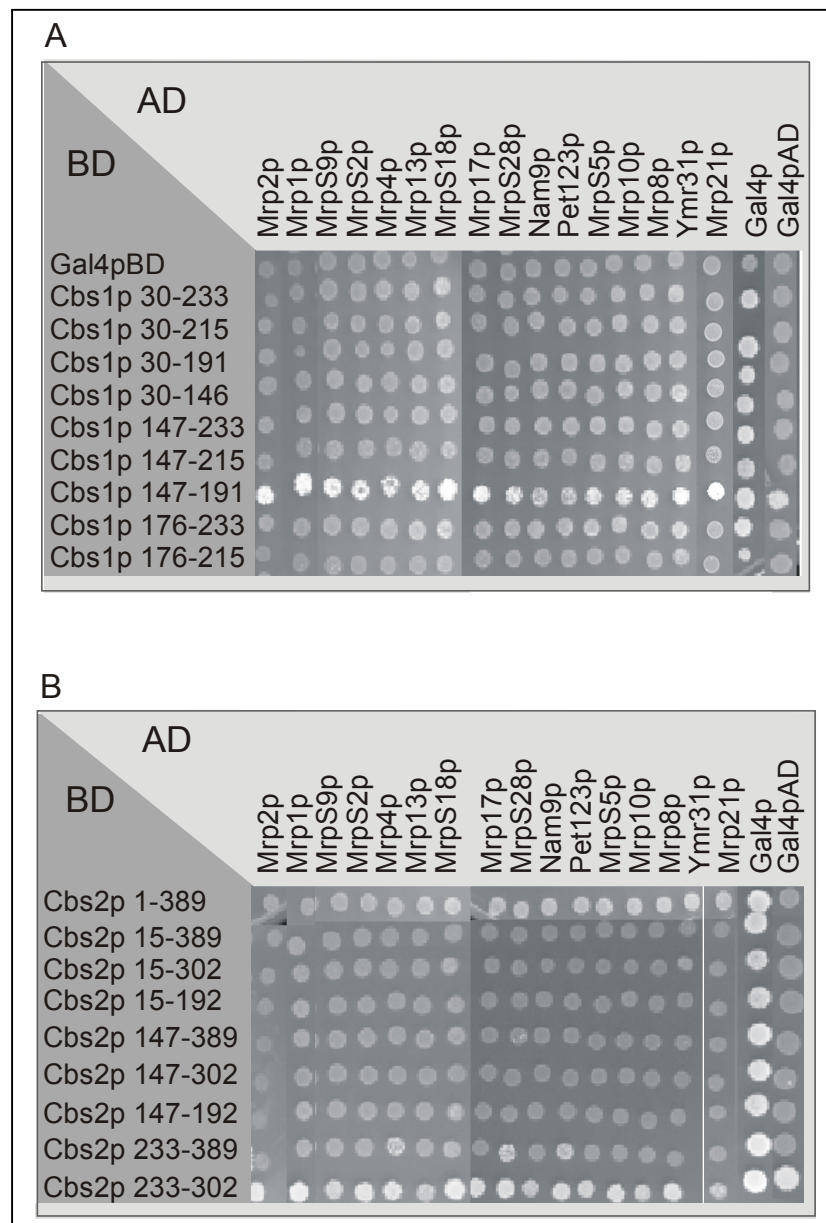


Abb. 26: Test auf Interaktion von Cbs1p (A) bzw. Cbs2p (B) mit Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten auf Selektivmedium ohne Histidin zum Nachweis der *HIS3*-Reporter-Gen-Aktivierung. Diploide Zellen (Kreuzung Y187/HF7c), die die angegebenen Proteine bzw. Proteinsegmente als Fusion mit Gal4pBD (BD) bzw. Gal4pAD (AD) in der entsprechenden Kombination co-exprimieren, wurden auf Selektivmedium ohne Histidin ausgebracht.

Obwohl die theoretische Verbindung der Interaktionspartner - besonders die zwischen Cbs2p und Pet123p (s. Einleitung zu diesem Kapitel) - gegeben ist, müssen diese Interaktionen aufgrund der fehlenden Aktivierung eines zweiten unabhängigen Reportergen (lacZ) als „falsch positiv“ im Sinne des Two Hybrid-Systems eingestuft werden.

3.4.6.4 Test auf Interaktion von Proteinen, die mit Cbs1p bzw. Cbs2p in Beziehung stehen könnten

Eine Reihe von mitochondrialen Proteinen sind aufgrund theoretischer Überlegungen potentielle Interaktionspartner von Cbs1p und Cbs2p. In erster Linie sind das Proteine, die ebenfalls direkt oder indirekt mit der COB-mRNA interagieren. Dazu gehören Cbp1p und Nam1p, die beide an der COB prä-mRNA Reifung beteiligt sind, und Cbp6p, ein weiterer Translationsaktivator der COB-mRNA (s. auch Einleitung).

Eine genetische Verbindung besteht zwischen Cbs2p und Abc1p, das an der Assemblierung von Komplex III beteiligt ist (Brasseur *et al.*, 1997) und als multi-copy Suppressor einer *cbs2*-Punktmutation identifiziert wurde (Bousquet *et al.*, 1991). Da vorstellbar ist, dass die Translationsaktivatoren Kontakt zu den Proteinen aufnehmen könnten, die unmittelbar den Ort der Insertion und Assemblierung der naszierenden Polypeptidkette von Apocytochrom *b* definieren, wurden auch die matrixseitig orientierten Untereinheiten von Komplex III (Qcr6p, Qcr7p, Qcr9p und Qcr10p) sowie Rip1p (Fe/S-Protein) und Cyt1p verwendet.

Um zu prüfen, ob alle mitochondrialen mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren möglicherweise interagieren und eine Art „Plateau“ für die Kontaktaufnahme der mitochondrialen Ribosomen und den spezifischen mRNAs bilden, wurden auch die Translationsaktivatoren der COX3-mRNA (Pet122p, Pet494p und Pet54p) mit der Gal4pAD fusioniert.

Des weiteren wurden Phb1p und Phb2p, die an der Degradation von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran beteiligt sind (Steglich *et al.*, 1999), in die Untersuchung einbezogen. Eine Interaktion mit diesen Proteinen könnte das naszierende Protein bei der Insertion in die Membran dirigieren, wobei nicht-assembliertes Cytochrom *b* dem proteolytischen Abbau zugeführt werden könnte.

Letztlich wurde Tim13p, eine Komponente der Translokationsmaschinerie der inneren Mitochondrienmembran, für das Two Hybrid-System kloniert. Das homologe Protein aus *S. pombe* wurde beim Screening einer cDNA-Bank mit Gal4pBD::Cbs2p(1-389) isoliert (s. 3.4.5.2). Die Klonierungen der Fusionskonstrukte erfolgte wie beschrieben (s. 2.2.2.14.2). Die Ergebnisse des Two Hybrid-Experimentes sind in Abb. 27 dargestellt.

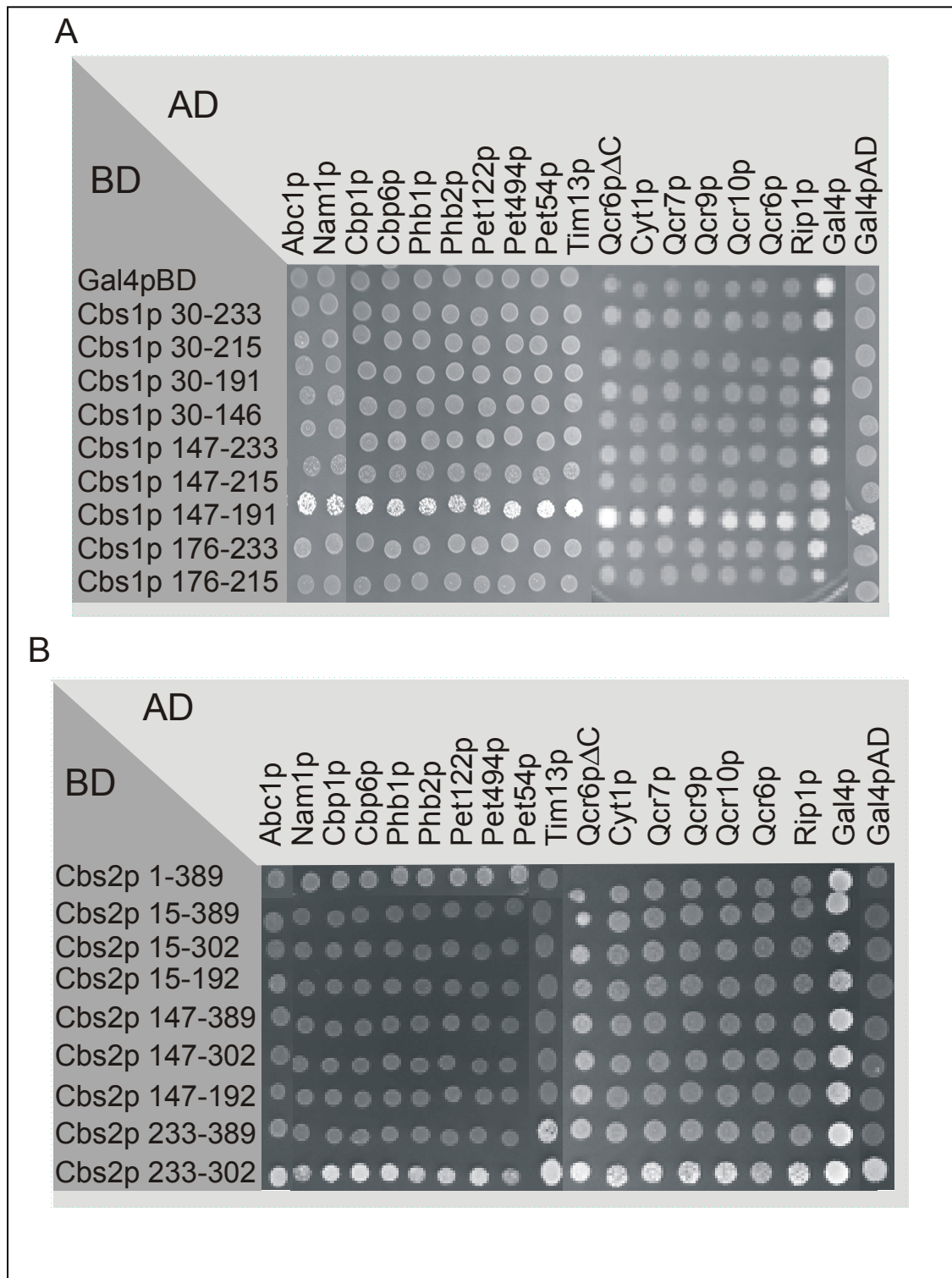


Abb. 27: Test auf Interaktion von Cbs1p (A) bzw. Cbs2p (B) mit potentiellen Interaktionskandidaten

Zum Nachweis der *HIS3*-Reporter-gen-Aktivierung wurde das Wachstum von Zellen, die die angegebenen Fusionsproteine mit Gal4pAD (AD) bzw. Gal4pBD (BD) co-exprimieren, auf Selektivmedium ohne Histidin getestet.

Die Funktionalität dieses Two Hybrid-Screenings konnte sowohl durch das Wachstum der mit Gal4p transformierten Zellen auf Selektionsmedium ohne Histidin als auch durch die Negativkontrollen in Kombination mit dem entsprechenden Insert-freien Partnervektor belegt werden (Abb. 27). Die transaktivierende Fähigkeit von Cbs1p₁₄₇₋₁₉₁ bzw. Cbs2p₂₃₃₋₃₀₂ wurde bereits erwähnt (s. 3.4.6.2 und 3.4.6.3). Aus Abb. 27 wird deutlich, dass bis auf eine Ausnahme (Gal4pBD::Cbs2p(233-389)) in keinem weiteren Fall ein Wachstum der entsprechenden Diploiden auf dem Selektionsmedium ohne Histidin beobachtet werden konnte. Mit Hilfe des Two Hybrid-Systems konnte somit zwischen den genannten Proteinen keine physikalische Interaktion nachgewiesen werden. Bei der Ausnahme handelt es sich um die Partner Gal4pBD::Cbs2p(233-389) und Gal4pAD::Tim13p.

Wie bereits beschrieben (s. oben), wurde das Tim13p-Homologe aus *S. pombe* (Ydf9p) durch ein Two Hybrid-cDNA-Bankscreening als potentieller Cbs2p-Interaktionskandidat isoliert. Interessanterweise führte beim Test des *S. cerevisiae* Proteins nur ein C-terminales Cbs2p-Proteinsegment zur Aktivierung von *HIS3*. Allerdings fiel der zugehörige β -Galaktosidase-Assay negativ aus. Dieser Befund erinnert an die Ergebnisse aus anderen Screening-Experimenten mit dem Konstrukt Gal4pBD::Cbs2p(233-389). In mehreren Fällen konnte dabei zwar eine Aktivierung von *HIS3* beobachtet werden, wobei der Nachweis der *lacZ*-Aktivierung negativ ausfiel (vgl. Abb. 26 und 27).

Mit Hilfe des Two Hybrid-Systems konnten somit keine Interaktionen zwischen Cbs1p bzw. Cbs2p mit Proteinen gefunden werden, die mit den beiden Translationsaktivatoren theoretisch in Zusammenhang stehen könnten.

3.4.6.5 Interaktionsscreening der verwendeten Two Hybrid-Fusionsproteine

Abschließend wurden die Gal4pAD-Fusionen im Stamm HF7c und Gal4pBD-Fusionen im Stamm Y187 eingesetzt, um nach Interaktionen innerhalb der Gruppe der für den Direkttest klonierten Proteine zu suchen. Das Screening wurde wie bereits beschrieben (s. 3.4.6.1) durchgeführt. Zunächst wurde auf diploide Hefezellen selektiert, die in der Lage sind, auf Minimalmedium ohne Histidin zu wachsen

(Abb. 28). Von positiven Klonen wurden die diploiden Zellen in Flüssigmedium propagiert und im semi-quantitativen β -Galaktosidase-Assay (s. 3.4.6.1) auf die Aktivierung des zweiten Reportergenes überprüft. Proben, bei denen der Messwert deutlich oberhalb des Mittelwertes der Negativkontrollen lag, wurden für den quantitativen Enzym-Assay (s. 2.2.2.14.3) ausgewählt. Dazu wurden die entsprechenden Plasmide in einem unabhängigen Experiment erneut in den Stamm Y187 co-transformiert.

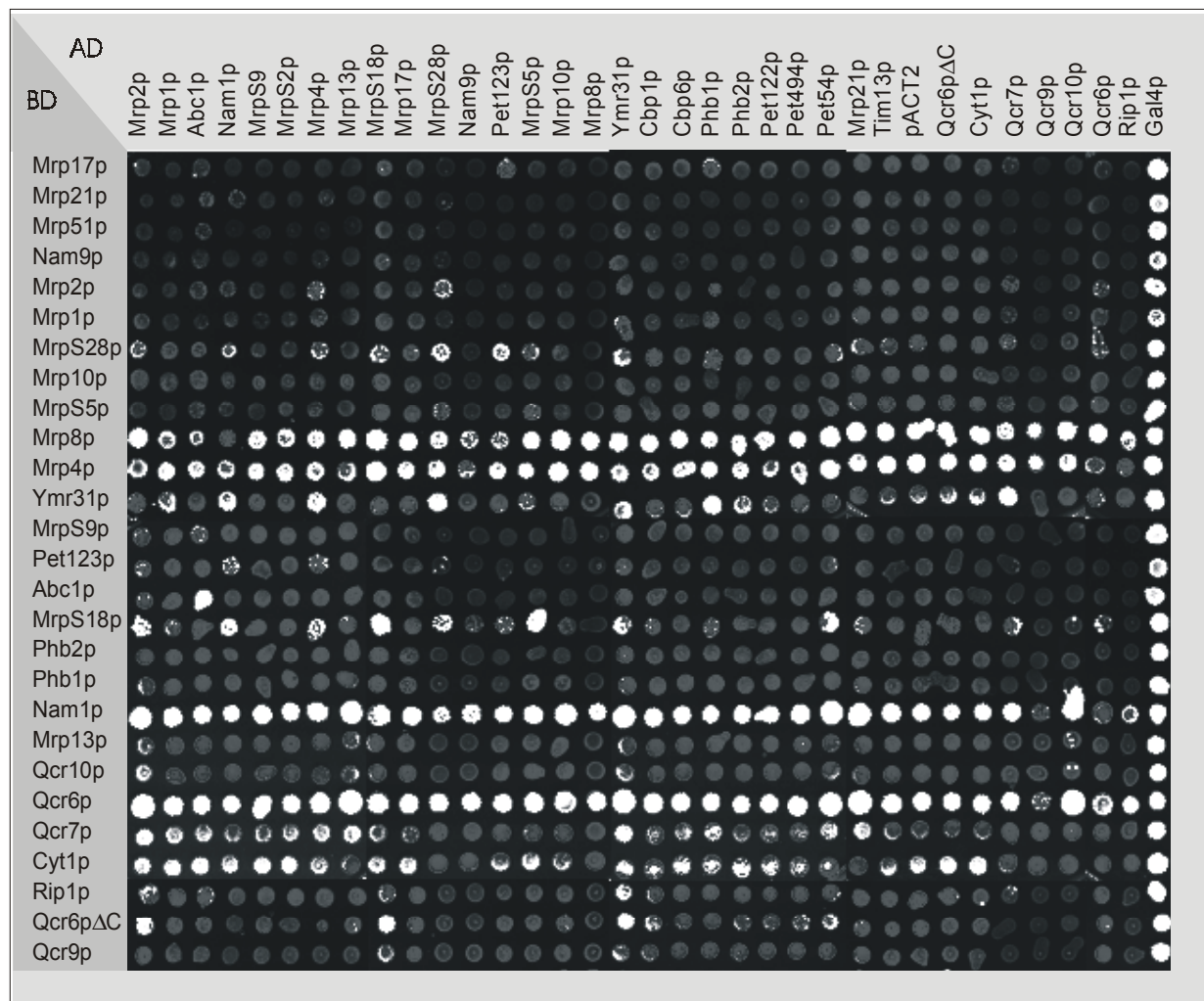


Abb. 28: Two Hybrid-Interaktionsscreening

Plasmide, die für die angegebenen Proteine als Gal4pAD (AD)- bzw. Gal4pBD (BD)-Fusionen kodieren, wurden in die Stämme HF7c bzw. Y187 transformiert. Die entsprechenden Plasmidpaare (AD/BD) wurden durch Kreuzung der Stämme kombiniert. Die diploiden Zellen wurden auf Selektivmedium ohne Histidin auf Aktivierung des *HIS3*-Reportergenes getestet.

Aus Abb. 28 geht hervor, dass die Gal4pBD-Fusionen mit Mrp8p, Mrp4p, Nam1p und Qcr6p in allen Gal4pAD-Kombinationen zum Wachstum der Diploiden auf dem Selektivmedium ohne Histidin führten. Diese Proteine wirken offensichtlich transaktivierend und werden im weiteren nicht berücksichtigt. Klone, die Gal4pAD (Negativkontrolle) exprimieren, führten nur in Kombination mit den oben erwähnten transaktivierenden Proteinen zum His⁺-Phänotyp. Das Wachstum der mit der Positivkontrolle (Gal4p) transformierten Zellen beweist die Funktionalität des Assays.

Von den 891 Kreuzungskombinationen konnte bei 59 Ansätzen ein Wachstum auf Selektionsmedium ohne Histidin verzeichnet werden (Abb. 28). Zellen dieser 59 Ansätze wurden jeweils in Flüssigmedium propagiert und im semi-quantitativen Assay (s. 3.4.6.1) auf die Aktivierung des *lacZ*-Reportergen getestet.

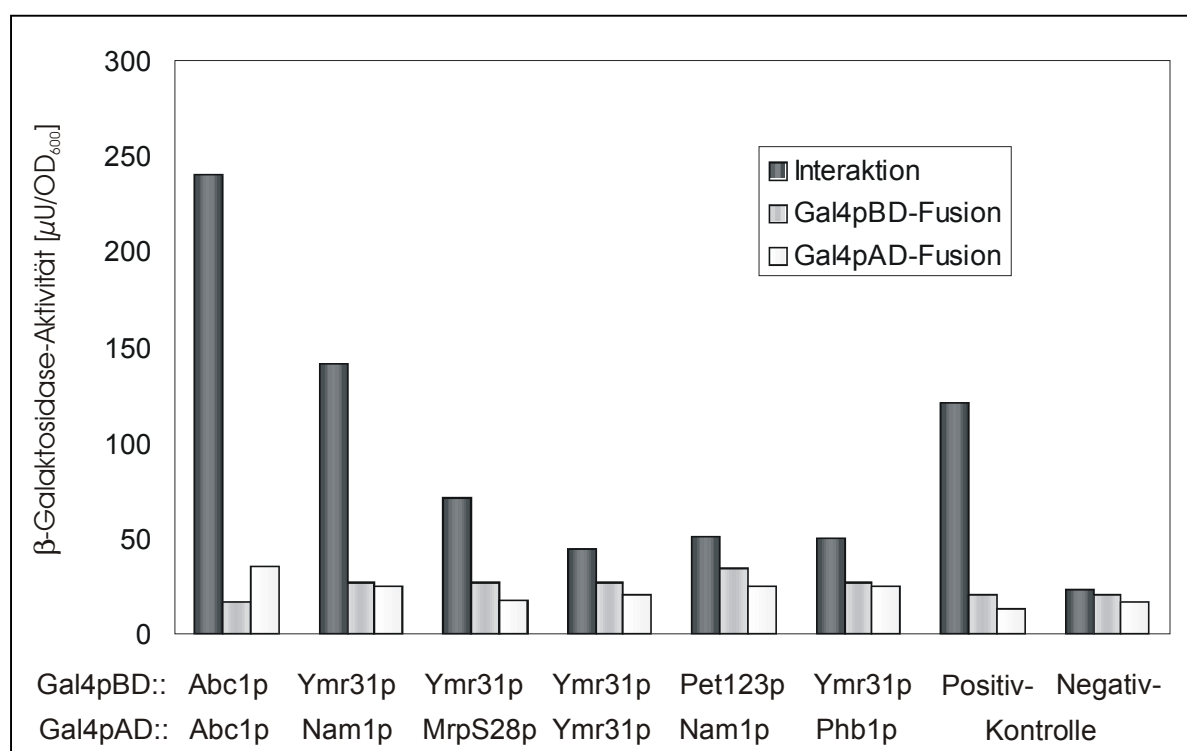


Abb. 29: **Quantitativer β-Galaktosidase-Assay**

Die angegebenen Gal4pBD- bzw. Gal4pAD-Fusionsproteine wurden im Stamm Y187 co-exprimiert und die korrespondierende Aktivität der β-Galaktosidase bestimmt.

Bei 13 Proben lag der Messwert für die β -Galaktosidase-Aktivität deutlich oberhalb des Mittelwertes der Negativkontrollen bzw. dem Mittelwert der verbleibenden 46 Ansätze. Die 13 potentiell interagierenden Kombinationen wurden in einem quantitativen Assay nach Co-Transformation der entsprechenden Two Hybrid-Partner in den Stamm Y187 detaillierter charakterisiert.

Als Positivkontrolle für eine Interaktion wurden die Vektoren pVA3 und pTD1 transformiert, die für Gal4pBD::p53(72-390) bzw. Gal4pAD::SV40-T-antigen(84-708) kodieren (ClonTech). Als Negativkontrolle wurden die Insert-freien Vektoren pODB80 und pACT2 co-transformiert. Außerdem wurden die entsprechenden Gal4pBD- bzw. Gal4pAD-Fusionen separat transformiert, um das Basallevel der Transkriptionsaktivierung zu ermitteln.

In Abb. 29 sind die Ergebnisse des quantitativen β -Galaktosidase-Assays grafisch dargestellt. Neben der Positivkontrolle konnte bei den Kombinationen Gal4pBD::Abc1p(48-501) mit Gal4pAD::Abc1p(48-501) und Gal4pBD::Ymr31p mit Gal4pAD::Nam1p eine deutliche Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität verzeichnet werden. Interessanterweise ist Gal4pBD::Ymr31p noch in 3 weiteren Ansätzen mit Gal4pAD::MrpS28p, ::Ymr31p bzw. ::Phb1p involviert. Die β -Galaktosidase-Aktivität liegt zwar auch in diesen, wie auch bei der Kombination Gal4pBD::Pet123p mit Gal4pAD::Nam1p, über den Referenzkontrollen, allerdings nur etwa um den Faktor 2. Proben, bei denen die Messwerte für die Interaktion nicht signifikant über den Werten der Negativkontrolle lagen, wurden nicht berücksichtigt. Somit verbleiben von den 13 Ansätzen des semi-quantitativen Assays noch 7 Proben, die als potentiell interagierende Partner identifiziert werden konnten.

Die mit dem Two Hybrid-System gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Abc1p wahrscheinlich homomerisiert. Diese Interaktion konnte im Two Hybrid-System jedoch nur nachgewiesen werden, wenn die N-terminalen 47 As - die putative mitochondriale Targeting-Sequenz - von Abc1p deletiert wurden (Daten nicht gezeigt). Interessant sind auch die Hinweise auf eine Interaktion zwischen Nam1p, das an der Reifung der COB prä-mRNA beteiligt ist, und den Proteinen der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit - Ymr31p bzw. Pet123p.

Möglicherweise interagiert Ymr31p auch mit Phb1p und Mrps28p bzw. homomerisiert. Eine detaillierte Wertung der identifizierten potentiellen Interaktionen erfolgt im Diskussionsteil dieser Arbeit.

3.5 *In vitro*-Bindungsassays mit Nam1p-GST-Fusionen

Um dem Two Hybrid-System eine weitere Methode zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen an die Seite zu stellen, wurde Cbs1p bzw. Cbs2p N-terminal mit GST fusioniert, um die resultierenden Fusionsproteine in „pull-down“-Experimenten einsetzen zu können. Zwar konnten beide GST-Fusionsproteine immunologisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), aber eine Überexpression im *E. coli*-Stamm BL21 konnte selbst nach Variation und Optimierung der Expressionsbedingungen nicht erreicht werden. Aus diesem Grunde sollten potentielle Interaktionskandidaten, die bereits im Rahmen der Two Hybrid-Analysen erwähnt wurden (s. 3.4.6.4), mit GST fusioniert werden, um die Interaktion mit Cbs1p bzw. Cbs2p zu untersuchen.

Zunächst wurde Nam1p, welches verantwortlich für die Prozessierung und Stabilität des intronhaltigen *COB*-Transkriptes ist, N-terminal mit GST fusioniert, im *E. coli*-Stamm BL21 überexprimiert (Abb. 30) und über Gluthation-S-Sepharose aufgereinigt (s. 2.2.3.6.1).

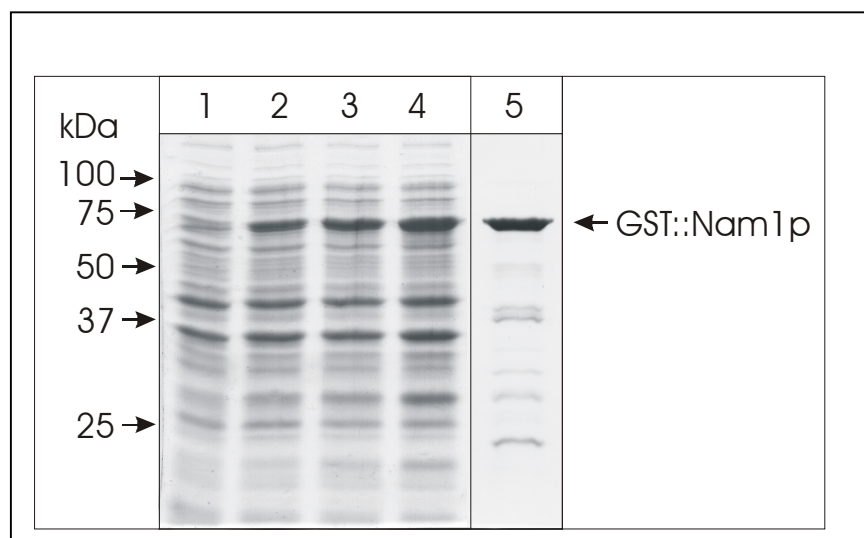


Abb. 30: Expression und Aufreinigung von GST::Nam1p(16-440)

Die Expression des GST-Fusionsproteins mit Nam1p (As 16-440) erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21. Aliquots der Zellkultur wurden vor (Spur 1) bzw. nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG (Inkubationsdauer: Spur 2: 30 min; Spur 3: 1 h bzw. Spur 4: 2 h) entnommen. Die Proteine wurden anschließend im SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. In Spur 5 sind 20 µl (ca. 30 µg Protein) der Sepharose nach Kopplung des Fusionsproteins und intensiver Waschschrte aufgetragen.

Die GST::Nam1p-gekoppelte Sepharose wurde mit Lysaten aus Hefezellen inkubiert (s. 2.2.3.6.3), die die Gal4pBD-Fusionsproteine mit Ymr31p(9-123), Pet123p(21-318), Cbs1p(30-233) oder Cbs2p(1-389) exprimieren. Ymr31p und Pet123p wurden im Two Hybrid als potentielle Interaktionskandidaten für Nam1p gefunden (s. 3.4.6.5). Ein Nachweis der Expression der Cbs1p- und Cbs2p- Fusionsproteine ist in Abb. 22 dargestellt. Als Negativkontrollen wurden Lysate mit Gal4pBD verwendet bzw. GST-gekoppelte Sepharose eingesetzt. Nach intensiven Waschschritten der Proben wurden die Sepharose-assoziierten Proteine einer Western-Analyse mit Antikörpern gegen Gal4pBD unterzogen (Abb. 31).

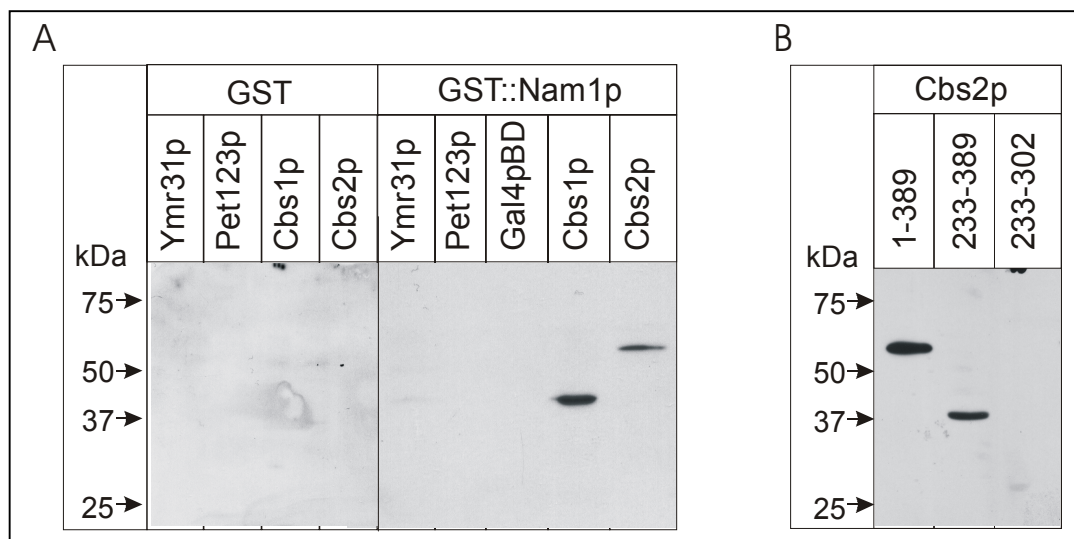


Abb. 31: *In vitro*-Bindungsassays mit GST::Nam1p gekoppelter Sepharose

Lysate aus Zellen, die Gal4pBD bzw. die Gal4pBD-Fusionsproteine mit Ymr31p(9-123), Pet123p(21-318), Cbs1p(30-233), Cbs2p(1-389) (A) oder Gal4pBD::Cbs2p(1-389) und die Gal4pBD-Chimären der Cbs2p-Derivate (As 233-389 bzw. 233-302) (B) exprimieren, wurden mit GST::Nam1p gekoppelter Sepharose (A, B) bzw. mit GST-gekoppelter Sepharose (A) inkubiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung einer Western-Analyse unter Verwendung von Gal4pBD-Antikörpern unterzogen.

Wie aus Abb. 31(A) ersichtlich, wird Gal4pBD nicht durch das Sepharose-gekoppelte GST::Nam1p präzipitiert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Gal4pBD-Anteil der Fusionsproteine selbst mit GST und/oder Nam1p physikalisch wechselwirkt. Auch GST ist separat nicht in der Lage, die Gal4pBD-Fusionsproteine zu binden.

Darüber hinaus konnten auch die Fusionen Gal4pBD::Ymr31p(9-123) und Gal4p::Pet123p(21-318) durch GST::Nam1p nicht präzipitiert werden. Damit konnten die im Two Hybrid gefundenen Interaktionen nicht bestätigt werden.

Überraschenderweise kann allerdings mit GST::Nam1p beladener Sepharose sowohl Gal4pBD::Cbs1p(30-233) als auch Gal4pBD::Cbs2p(1-389) präzipitiert werden. Da die Bindung, wie oben beschrieben, nicht auf einer Interaktion des Gal4pBD-Anteils bzw. einer Assoziation von Cbs1p bzw. Cbs2p mit GST beruht, kann angenommen werden, dass dieses Ergebnis spezifisch durch Nam1p hervorgerufen wird. Das würde bedeuten, dass sowohl Cbs1p als auch Cbs2p mit Nam1p physikalisch wechselwirken können. Darüber hinaus konnte durch GST::Nam1p ein Cbs2p-Derivat, welches die As 233-389 umfasst, präzipitiert werden. Im Gegensatz dazu vermittelten die an Gal4pBD fusionierten As 233-302 von Cbs2p offensichtlich keine Bindung mehr. Möglicherweise beschränkt sich die physikalische Interaktion von Cbs2p mit Nam1p auf die C-terminalen 87 As von Cbs2p.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Interaktionen nicht direkt, sondern beispielsweise über Proteine der Ribosomen oder einer COB-mRNA-Brücke aufrechterhalten werden.

Bei diesen Experimenten erfolgte sowohl der Aufschluss der Hefezellen zur Präparation des Zell-Lysates mit den Gal4pBD-Fusionsproteinen als auch die Bindungs- und Waschschrte unter wenig stringenten Bedingungen in Abwesenheit reduzierender Agenzien. In einer zweiten Versuchsreihe wurden alle Schritte in Anwesenheit von 1 mM DTT durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten die Interaktionen von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Nam1p nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Im Diskussionsteil der Arbeit wird dieser Befund näher analysiert.

4 Diskussion

4.1 Replacement des CBS1-Leserahmens und bioinformatische Analysen von CBS1 und des überlappenden ORFs YDL068w

Bisherige Studien zu Cbs1p wurden mit dem *cbs1*-Disruptionsstamm GDV0 (Rödel *et al.*, 1986) durchgeführt. Der durch die Disruption im C-terminalen Drittel des Leserahmens unbeeinträchtigte 5'-seitige Bereich wird transkribiert (Forsbach, 1989) und könnte zur Synthese eines die N-terminalen 155 As von Cbs1p umfassenden Polypeptids führen (Abb. 1). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses trunkierte Protein dennoch einen Teil der physiologischen Funktion des Gesamtproteins übernehmen kann oder in einer anderen Weise aktiv ist. Besonders bei Proteinen mit Domänenaufbau können Proteinsegmente, die diese Domänen beinhalten, unabhängig voneinander und separat funktionell sein, wie beispielsweise die DNA-Bindedomäne bzw. die Aktivator-domäne von Gal4p (Keegan *et al.*, 1986). Aus diesem Grund wurde der komplette CBS1-Leserahmen durch homologe Integration einer *Sphis5⁺* Kasette (s. 3.1.1, Abb. 2) substituiert.

Beim phänotypischen Vergleich der Stämme mit *cbs1*-Disruption bzw. -Replacement konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Beim Ausfall von Cbs1p kann kein Cytochrom *b* synthetisiert (Rödel *et al.*, 1986) und letztlich keine intakte Atmungskette assembliert werden. Der daraus resultierende Ausfall des Wachstums auf Medien mit nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen konnte auch für den Stamm mit *cbs1*-Replacement bestätigt werden.

Bei weiteren Analysen, die auf eine Charakterisierung von möglichen Interferenzen der im Disruptionsstamm möglicherweise exprimierten N-terminalen 155 As von Cbs1p ausgerichtet waren, konnten keine Hinweise auf Unterschiede zwischen der Disruption und dem Replacement gefunden werden.

Bemerkenswert ist das Verhalten beider Stämme auf galaktosehaltigen Medien. Da in wt-Stämmen Galaktose normalerweise fermentativ verwertet wird, war nicht zu erwarten, dass die *cbs1*-Nullmutanten diese Kohlenstoffquelle nicht metabolisieren können (Tab. 3). Offensichtlich bedarf die Galaktoseverwertung in diesen Stämmen einer intakten Atmungskette.

Die Abhängigkeit der Galaktoseverwertung von der Respiration wurde bereits von Spiegelman (Spiegelman, 1945) bei einigen Stämmen von *S. cerevisiae* beobachtet und inzwischen als Phänotyp verschiedener Mutantenallele von Genen des Galaktosestoffwechsels (*GAL1*, *GAL2*, *GAL3*, *GAL4* und *GAL5*) beschrieben (Algeri *et al.*, 1981; Donnini *et al.*, 1992; Douglas and Hawthorne, 1964). Beispielsweise kann eine Hefezelle mit einem *gal2* Hintergrund nur unter Erhalt der Atmungskompetenz Galaktose verwerten (Donnini *et al.*, 1992). Wird bei diesen *gal2* Mutanten durch Antimycin-Gabe die Respiration blockiert, kommt es auch zum Erliegen der Galaktoseverwertung. Zu einem identischen Ergebnis führte die Ethidiumbromidbehandlung von *gal2* Zellen, die dadurch ihre mitochondriale DNA verlieren (*rho*⁰) und somit keine intakte Atmungskette aufbauen können. Möglicherweise kann in diesen Mutanten Galaktose nur über einen zweiten, allerdings ATP-abhängigen Transporter importiert werden. Eine negative Energiebilanz durch den zusätzlichen Verlust eines ATP-Moleküls beim Import könnte eine Erklärung für das atmungsabhängige Wachstum auf Galaktose sein. Möglicherweise liegt auch im Ausgangsstamm (DBY747) beider *cbs1*-Nullmutanten eine Mutation in einem der Gene des Galaktosestoffwechsels (s. oben) vor, deren Phänotyp erst durch den zusätzlichen Ausfall der Atmungskette infolge der *cbs1*-Mutation auf Galaktosemedium auffällig wird.

Durch die Disruption bzw. das Replacement des *CBS1*-Leserahmens wird auch der den *CBS1*-Leserahmen überlappende ORF YDL068w in unterschiedlichem Maße betroffen (Abb. 3). Während im Disruptionsstamm (GDV0) allenfalls Bereiche des Promotors zerstört sind, wird durch das Replacement von *CBS1* (UKB1) auch der komplette YDL068w-Leserahmen deletiert. Daher war nicht auszuschließen, dass im UKB1 zusätzliche Effekte auftreten, die auf den Ausfall des von YDL068w kodierten Proteins und nicht auf den Ausfall von Cbs1p zurückzuführen sind. Der Vergleich beider Stämme hinsichtlich des Wachstumsverhaltens auf unterschiedlichen fermentierbaren und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen sowie unter osmotischen Stressbedingungen gab keine Indizien auf einen von der bereits charakterisierten *cbs1*-Mutante abweichenden Phänotyp. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der ORF YDL068w für ein essentielles Protein kodiert.

Da keine experimentellen Daten zur Transkription des überlappenden ORFs vorliegen, sollen im folgenden die bioinformatischen Ergebnisse von gesamtgenomischen Transkriptionsstudien in bezug auf *CBS1* und YDL068w analysiert werden.

Bei der genomweiten Analyse der Genexpression unter verschiedenen physiologischen Gesichtspunkten, wie „diauxic shift“ von Glucose- zu Ethanolverwertung (DeRisi *et al.*, 1997), Zellzyklus (Spellman *et al.*, 1998) und Sporulation (Chu *et al.*, 1998), wird für *CBS1* eine geringe, unter den getesteten Bedingungen relativ unveränderte Expression gezeigt. Das bedeutet im ersten Fall, dass *CBS1* offensichtlich nicht durch Glucose reprimiert wird. Dies steht im Widerspruch zu den Befunden der Expressionsstudien von *CBS1-lacZ*-Genfusionen (Forsbach *et al.*, 1989). Dabei wurde eine ca. dreifache Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität gemessen, wenn die entsprechenden Zellen in Medium mit 3 % Glucose kultiviert wurden. Diese Daten stehen auch im Einklang mit der Abundanz des *CBS1*-Transkripts unter den betrachteten Wachstumsbedingungen in Northern-Analysen (Forsbach *et al.*, 1989).

Das spricht für eine Reprimierbarkeit der Cbs1p-Expression durch Glucose. Offensichtlich ist die auf Micro-Arrays basierende Analyse von Transkriptionsfluktuationen nicht geeignet, zuverlässige Daten zur Expression jedes einzelnen Genes zu produzieren. Vielmehr liegt der Vorteil einer genomweiten Analyse eher in der Detektion von Genen, die auffällig ihr Expressionsmuster unter den gegebenen experimentellen Bedingungen verändern. *CBS1* gehört zu den Genen mit sehr gering abundanter mRNA (Forsbach *et al.*, 1989). Möglicherweise könnte dieser Umstand dazu beitragen, dass der Nachweis einer Repression mit der Micro-Array-Technik, aufgrund geringer Sensitivität nicht möglich ist.

Betrachtet man die Ergebnisse der oben angeführten genomweiten Expressionanalysen hinsichtlich der YDL068w-Transkription, so fällt ein der *CBS1*-Expression vergleichbares Muster auf. Dies würde *per se* bedeuten, dass der ORF transkribiert wird.

Bei Betrachtung des methodischen Hintergrundes der Mikro-Array-Herstellung für diese Analysen wird allerdings deutlich, dass bei überlappenden ORFs nicht zwischen den Expressionsmustern der einzelnen ORFs differenziert werden kann. Die fast 6400 Leserahmen von *S. cerevisiae* wurden dabei mittels PCR amplifiziert und auf ein Mikro-Array aufgebracht. Somit enthält die Probe „*CBS1*“ auch komplementäre Sequenzen zum ORF YDL068w und umgekehrt. Die Hybridisierungssignale können demnach von der mRNA (bzw. cDNA) beider ORFs stammen.

Mit dem Einsatz von „high density oligonucleotide arrays“ (HDAs, (Wodicka *et al.*, 1997)) kann dieses Problem umgangen werden, da jedes Gen durch bis zu 20 25mere Oligonukleotide repräsentiert wird, die an die mRNA (bzw. eine über die cDNA hergestellte cRNA) des entsprechenden ORFs binden. Für die gesamt-genomische Expressionsanalyse des Effektes von Mutationen in verschiedenen Proteinen der Transkriptionsmaschinerie wurde diese Methode angewandt (Holstege *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte bei diesem Assay (zweifache Versuchsdurchführung) für den ORF YDL068w keine Expression nachgewiesen werden. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass der den *CBS1*-Leserahmen überlappende ORF möglicherweise nicht transkribiert wird und deshalb den *cbs1*-Phänotyp nicht überlagern kann. Obwohl diese Art von Arrays eine hohe Sensitivität erlauben (Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mRNA-Kopie pro Zelle) kann eine Expression nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Alle hier aufgeführten Indizien sprechen jedoch eher gegen eine Transkription von YDL068w. Ein experimenteller Beleg könnte beispielsweise durch RT-PCR mit *CBS1*- bzw. YDL068w-spezifischen Primern erbracht werden.

Durch die bereits beschriebene gesamt-genomische Expressionsanalyse (s.oben) konnte für *CBS1* - im Gegensatz zu YDL068w - eine Transkription nachgewiesen und die Abundanz des *CBS1*-Transkripts mit 0,3 mRNA-Kopien/Zelle errechnet werden (Holstege *et al.*, 1998). Die durchschnittliche Abundanz für das untersuchte Transkriptom liegt bei 2,8 mRNA-Kopien/Zelle, wobei 80 % der Gene mit 0,1 bis 2 Kopien/Zelle exprimiert werden. Diese vergleichsweise sehr geringe Transkriptkonzentration korreliert mit den Ergebnissen der Northern-Analysen von *CBS1* (Forsbach *et al.*, 1989). Die sehr geringe Expression könnte ein Hinweis auf eine mögliche regulatorische Funktion von Cbs1p sein.

Interessant sind die Daten der Transkriptom-Analyse (Holstege *et al.*, 1998) auch hinsichtlich der Abhängigkeit der *CBS1*-Transkription von verschiedenen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie. Mutationen in den Genen für Untereinheiten des RNA-Polymerase II Holoenzym (RPB1, SRB4) führen erwartungsgemäß auch zur Reduzierung der Transkription von *CBS1*, da diese Faktoren essentiell für die generelle Transkription sind. Für ca. 100 % der im Transkriptom untersuchten Gene konnte eine Abhängigkeit der Expression von diesen beiden Untereinheiten gefunden werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden für *CBS1* in Abhängigkeit von weiteren Komponenten, wie TFIIH (*KIN28*) und TFIID (*TAF17*), ermittelt. Der TFIIH-Komplex phosphoryliert die größte Polymerase II (Pol II)-Untereinheit und verknüpft die Pol II-Transkription mit Prozessen der DNA-Reparatur und des Zellzyklus (Struhl, 1995). Der TFIID-Komplex beinhaltet das TATA-Element-Bindeprotein, welches mit weiteren Transkriptionsaktivatoren assoziiert vorliegt. Beide Komplexe gehören zur Gruppe der generellen Transkriptionsfaktoren der Pol II-Transkription (Struhl, 1995).

Hingegen scheinen Mutationen im SRB-CDK-Komplex (*SRB10*), im globalen SWI-SNF-Transkriptionsaktivator-Komplex (*SWI2*), sowie im nukleosomalen Histon-Acetyltransferase-Komplex (*GCN5*) keine Auswirkung auf die Expression von *CBS1* zu haben. Der SRB-CDK-Komplex phosphoryliert die große Untereinheit der RNA-Pol II und vermittelt beispielsweise als negativer Regulator die Glucoserepression (Myer and Young, 1998). Der SWI-SNF-Transkriptionsaktivator-Komplex, der eine ATP-abhängige Chromatin-destabilisierende Aktivität besitzt, wirkt vermutlich als Antagonist der auf Chromatin basierenden Transkriptionsrepression (Myer and Young, 1998). Die Acetylierung der Histone durch den nukleosomalen Histon-Acetyltransferase-Komplex (SAGA) beeinflusst ebenso die Chromatin-abhängige Transkription. Genomweit sind durch die Mutationen in *srb10*, *swi2* bzw. *gcn5* nur 10 %, 6 % bzw. 5 % der Gene in der Expression betroffen (Holstege *et al.*, 1998). Die unterschiedlichen Expressionsmuster durch Mutationen in spezifischen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie implizieren, dass Gen-abhängige Aktivatoren nur mit bestimmten Komponenten interagieren. Der Expression von *CBS1* kann aus diesen Daten kein spezifischer Faktor zugeordnet werden.

4.2 Die Membranassoziation von Cbs1p

Die Lokalisierung von mitochondrialen mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren wurde zuerst von Michaelis *et al.* (Michaelis *et al.*, 1991) am Beispiel von Cbs1p beschrieben. Inzwischen wurden für weitere Proteine, die an der Translation von mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe beteiligt sind, eine matrixseitige Assoziation mit der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 8) gibt einen diesbezüglichen Überblick.

Protein	Ziel-mRNA	Art der Membran-assoziation	Methode	Referenz
Pet494p	COX3	integral	alkalische Extraktion	(McMullin and Fox, 1993)
Pet122p	COX3	integral	alkalische Extraktion	(McMullin and Fox, 1993)
Pet54p	COX3	peripher oder löslich	alkalische Extraktion	(McMullin and Fox, 1993)
Mss51p	COX2	peripher	alkalische Extraktion	(Siep <i>et al.</i> , 2000)
Pet309p	COX1	integral	alkalische Extraktion	(Manthey <i>et al.</i> , 1998)
Aep1	ATP9	?		
Aep2	ATP9	?		
Cbs2p	COB	löslich (oder schwach peripher membran-assoziiert)	alkalische Extraktion, TDC-Löslichkeit	(Michaelis <i>et al.</i> , 1991)

Tab. 8: **Die Membranassoziation von mRNA-spezifischen mitochondrialen Translationsaktivatoren**

Aus der Übersicht (Tab. 8) geht hervor, dass das Löslichkeitsverhalten der mitochondrialen Proteine unter alkalischen Extraktionsbedingungen als Kriterium für die Art der Membranassoziation eingesetzt wird. Proteine, die sich resistent gegenüber dieser Behandlung erweisen und mit der Membran-Fraktion präzipitiert werden können, werden als integrale Membranproteine klassifiziert (Fujiki *et al.*, 1982; Penefsky and Tzagoloff, 1971).

Cbs1p kann durch Alkalibehandlung vollständig solubilisiert werden (s. 3.2.2.2.2, Abb. 10). Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Cbs1p um kein integrales Membranprotein handelt. Dieser Befund wird durch das Ergebnis der Analyse zur Topologie von Cbs1p durch Proteinase K-Behandlung von Mitoplasten unterstützt (s. 3.2.3, Abb. 16). Bei einer Proteinase K-Konzentration, die hinreichend ist, die Proteine des Intermembranraumes abzubauen, kann das HA-tag tragende Cbs1p im Proteinase K-geschützten Kompartiment nachgewiesen werden. Da sich der HA-tag am C-Terminus des Proteins befindet, verfügt Cbs1p offensichtlich über keinen transmembranen Bereich, durch den der C-Terminus zum Intermembranraum hin exponiert wird. In diesem Fall würde der Proteinase K-vermittelte Verdau des HA-Epitops am C-Terminus den immunologischen Nachweis verhindern. Darüber hinaus lässt sich im SDS-PAA-Gel mit anschließender Western-Analyse keine schneller migrierende Proteinspezies nachweisen. Dies impliziert (mit der Einschränkung der Nachweisbarkeit von geringfügigen Verkürzungen (unter 10 As) des Proteins im SDS-Gel), dass auch der N-terminale Bereich von Cbs1p offensichtlich nicht in den Intermembranraum protrudiert.

Damit stehen die experimentellen Daten zur Cbs1p Membranassoziation in Einklang mit den Ergebnissen der computergestützten Analysen zur Primärstruktur (s. 3.2.1.2), wonach das Protein über keinen hydrophoben Bereich von ausreichender Länge verfügt, der als Transmembrananker fungieren könnte. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die Deletion des einzigen Bereiches nennenswerter Hydrophobizität im C-terminalen Segment von Cbs1p nicht zu einem löslichen Protein führt, wie man es erwarten würde, wenn ein Transmembrananker entfernt wird. Beispielsweise wird Cyt1p, integraler Bestandteil des Komplexes III der Atmungskette (resistent gegenüber der alkalischen Extraktion), in eine lösliche Form überführt, wenn das transmembrane Segment deletiert wird (Hamel *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte auch für *in vitro* importiertes Cbs1p gezeigt werden, dass der

überwiegende Teil des Proteins im Überstand der alkalischen Extraktion nachweisbar ist (Körte *et al.*, 1989).

Trotz seines hydrophilen Gesamtcharakters verhält sich Cbs1p nicht wie ein lösliches Protein. Das Protein verbleibt nahezu quantitativ im Membran-Pellet, wenn Ultraschall-behandelte Mitochondrien in Puffer niedriger Salzkonzentration aufgenommen werden (s. 3.2.2.2.2, Abb. 10). Lösliche oder nur schwach elektrostatisch assoziierte Proteine befinden sich dabei vollständig bzw. zum überwiegenden Teil im Überstand nach Sedimentation der Membran-Fraktion. Wird die Ionenstärke der Pufferlösungen erhöht, so können zunehmend die elektrostatischen Bindungen zwischen Proteinen bzw. Proteinen und den geladenen Lipidanteilen aufgehoben werden, die für eine Membranassoziation verantwortlich sind (Rosenberg, 1996). In Anwesenheit von 1 M NaCl kann beispielsweise die Citratsynthase - ein schwach membranassoziiertes Protein (Haggie and Brindle, 1999) - vollständig, das integrale Innenmembranprotein Sco1p hingegen nicht solubilisiert werden. Annähernd die Hälfte des Cbs1p sedimentiert unter diesen Hochsalz-Bedingungen mit der Membran-Fraktion. Das weist auf eine feste Assoziation von Cbs1p mit der inneren Mitochondrienmembran hin. Cbs1p ist somit ein peripher assoziiertes Membranprotein.

Ein ähnliches Löslichkeitsverhalten zeigt die peripher membranassoziierte β -Untereinheit der F1-ATPase (Atp2p) (Rep and Grivell, 1996a). Vergleichbar zur Situation bei Cbs1p lässt sich das Protein fast quantitativ durch die alkalische Extraktion solubilisieren, während unter Anwesenheit von 1 M NaCl etwa die Hälfte der Proteinmenge mit der Membran assoziiert bleibt.

Wie lassen sich diese Befunde der peripheren Membranassoziation von Cbs1p im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Taurodeoxycholat-Behandlung von Mitochondrien (Michaelis *et al.*, 1991) werten?

Bei diesem Experiment verhält sich Cbs1p wie das integrale Membranprotein Cytochrom c_1 (Cyt1p), da die Konzentration an Taurodeoxycholat (TDC), die notwendig ist, um Cbs1p zu solubilisieren, vergleichbar mit der ist, die für Cyt1p benötigt wurde. Mit anderen Worten, Cbs1p konnte erst im Überstand nachgewiesen werden, nachdem der Lipidbilayer durch das Detergenz zerstört wurde und gleichzeitig das Transmembran-verankerte Cyt1p „frei gab“.

TDC gehört zu den ionischen Detergenzien, trotzdem ist die denaturierende Wirkung auf Proteine offensichtlich sehr schwach. Beispielsweise wurden enzymatisch aktive Komplexe der Atmungskette (Schägger *et al.*, 1986) sowie mitochondriale Ribosomen (Partaledis and Mason, 1988) in Anwesenheit von TDC isoliert. Darüber hinaus findet das Detergenz Anwendung in der „blue-native“-Elektrophorese zur Isolation enzymatisch aktiver Proteinkomplexe (Schägger and von Jagow, 1991).

Die Solubilisierung von Cbs1p bzw. Cyt1p wurde bereits mit einer TDC-Konzentration von 0,2 % erreicht (Michaelis *et al.*, 1991). Diese TDC-Konzentration befindet sich beispielsweise unterhalb der Konzentration, die für die Isolation des intakten Proteinkomplexes der Ribosomen eingesetzt wurde (1 % TDC). Selbst unter diesen hohen Detergenz-Konzentrationen bleiben also die Protein-Protein-Wechselwirkungen der ribosomalen Untereinheiten bestehen.

Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass bei der für die Solubilisierung von Cbs1p eingesetzten TDC-Konzentration Protein-Protein-Interaktionen bestehen bleiben. Diese Versuche zur TDC-abhängigen Löslichkeit wurden in Gegenwart von 0,6 M NaCl durchgeführt. Da Cbs1p selbst in Anwesenheit von 1 M NaCl etwa zur Hälfte mit der Membran-Fraktion co-sedimentiert, liegt vermutlich der überwiegende Anteil von Cbs1p auch bei einer Salzkonzentration von 0,6 M membranassoziiert vor. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Überführung der membrangebundenen in die lösliche Form von Cbs1p nicht auf der Aufhebung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht, sondern vielmehr auf die Membran-lyisierende Wirkung von TDC zurückzuführen ist. Wie oben beschrieben, verfügt Cbs1p allerdings weder über einen Transmembrananker, einen Lipidanker noch ist es kovalent mit den Phospholipiden der Membran verknüpft. Die beiden letzteren Formen der Membranassoziation würden auch zu einem sich bei der alkalischen Extraktion resistent verhaltenden Protein führen.

Die Befunde lassen somit die Vermutung zu, dass Cbs1p durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit einem integralen Membranprotein an die innere Mitochondrienmembran assoziiert vorliegen könnte. Wird eine TDC-Konzentration erreicht, die hinreichend ist, den Lipidbilayer zu lysieren und damit integrale Membranproteine freizusetzen, so geht auch Cbs1p als assoziierter Partner des integralen Membranproteins in Lösung.

Die postulierte Membranverankerung für Cbs1p über ein integrales Membranprotein konnte beispielsweise für ein peripheres Protein der Cytoplasma-Membran - Sec7p - gezeigt werden. Durch chemisches Crosslinking konnten die Autoren ein 90 kDa integrales Membranprotein identifizieren, dass für die Membranverankerung von Sec7p verantwortlich ist (Wolf *et al.*, 1996). Das bereits erwähnte Atp2p (s. oben), mit einem ähnlichen Löslichkeitsverhalten wie Cbs1p, könnte auch über ein integrales Membranprotein in der Membran verankert vorliegen. Durch chemisches Crosslinking konnte Atp4p, ein potentiell integrales Membranprotein, als interagierender Partner detektiert werden (Soubannier *et al.*, 1999).

Als Kandidaten für die Membranverankerung von Cbs1p könnten Untereinheiten des Komplexes III eine Rolle spielen. Ein derartige Interaktion würde die COB-mRNA-beladenen Ribosomen in räumliche Nähe zum funktionellen Membran-Insertionsort des nascierenden Cytochroms *b* dirigieren. In diesem Zusammenhang erbrachten Experimente mit Hilfe der „blue-native“-Elektrophorese erste Hinweise auf eine mögliche Assoziation von Cbs1p mit einem höher molekularen Komplex (K. Tzschoppe, pers. Mitteilung).

Möglicherweise vermittelt auch ein den integral membranverankerten Translationsaktivatoren der COX3- bzw. COX2-mRNA (s. Tab. 8) analoges Protein, welches spezifisch für die COB-Translation verantwortlich ist, die Membranständigkeit von Cbs1p.

Weiterhin könnten integrale Membranproteine, die in der Assemblierung und/oder Stabilität von Untereinheiten der Komplexe der Atmungskette involviert sind, als Cbs1p-Membrananker fungieren. Beispielsweise agieren die Prohibitine (Phb1p; Phb2p) im Komplex als Membran-gebundene Chaperone zur Stabilisierung mitochondrialer Proteine (Nijtmans *et al.*, 2000). Phb1p und Phb2p sind jeweils über eine transmembrane Helix in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Steglich *et al.*, 1999) und bilden dort einen heteromeren Komplex von ca. 1 MDa (Nijtmans *et al.*, 2000). Interessanterweise führt der Ausfall von Mss51p, einem Translationsaktivator der COX1-mRNA, zur Erhöhung der Expression des Phb1p/2p-Komplexes infolge eines gestörten stöchiometrischen Verhältnisses von kern- bzw. mitochondrial kodierten Untereinheiten. Darüber hinaus konnten die Autoren eine Assoziation mit neu synthetisierten mitochondrialen Translationsprodukten (Cox2p und Cox1p) nachweisen (Nijtmans *et al.*, 2000).

Möglicherweise fungiert dieser Membrankomplex als Kontrollstelle für die korrekte Assemblierung weiterer oder vielleicht aller Atmungsketten-Komplexe. Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass neu synthetisiertes Cytochrom *b* - möglicherweise durch Bindung von Cbs1p vermittelt - über diesen Chaperon-Komplex in die innere Membran inseriert und entsprechend mit weiteren Untereinheiten von Komplex III assembliert wird. In diese Kategorie gehört auch Abc1p, das speziell an der Assemblierung von Komplex III beteiligt ist. Allerdings liegen über die Membranassoziation des Proteins keine experimentellen Daten vor.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen zum Löslichkeitsverhalten von Cbs1p in Mitochondrien eines *rho*⁰-Stammes interessant (s. 3.2.2.2.4). Im Gegensatz zur Situation in *rho*⁺-Zellen verhält sich Cbs1p in Zellen, die nicht mehr zur Expression der mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette befähigt sind, resistent gegenüber der alkalischen Behandlung. Das bedeutet, dass sich die Art der Membranassoziation unter diesen Bedingungen verändert. Die periphere Membranständigkeit von Cbs1p in *rho*⁺-Mitochondrien, die möglicherweise auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht und vermutlich die physiologisch aktive Form repräsentiert, kann in Abwesenheit der mitochondrial kodierten Proteine nicht aufrecht erhalten werden.

Denkbar wäre, dass durch den *rho*⁰-Status der Mitochondrien der Partner für die Membranverankerung von Cbs1p nicht synthetisiert werden kann oder indirekt durch das Fehlen der mitochondrialen Translationsprodukte proteolytisch abgebaut wird. Unter diesem Blickwinkel könnte Cytochrom *b* selbst oder aber andere Untereinheiten von Komplex III, die infolge der fehlenden mitochondrial kodierten Untereinheit abgebaut werden, als Interaktionspartner in Frage kommen. Beispielsweise konnten reduzierte Konzentrationen an Qcr1p, Qcr2p, Cyt1p, Rip1p, Qcr7p und Qcr8p beim Ausfall von Cytochrom *b* nachgewiesen werden (Rep and Grivell, 1996b). Von diesen Untereinheiten sind nur Cyt1p, Qcr7p und Qcr8p resistent gegenüber der alkalischen Extraktion (Boumans *et al.*, 1996). Da Qcr8p ausschließlich zum Intermembranraum hin orientiert ist, scheint dessen Interaktion mit Cbs1p unwahrscheinlich.

Gegen die oben erwähnte Assoziation von Cbs1p mit dem Prohibitin-Komplex spricht der Befund, dass die Konzentration an Phb1p/2p in *rho*⁰-Mitochondrien vergleichbar zu der in Mitochondrien aus *rho*⁺-Zellen ist (Nijtmans *et al.*, 2000).

Warum allerdings Cbs1p beim Fehlen des postulierten integralen Membranproteins als Membrananker nicht als lösliches Protein, sondern in Carbonat-resistenter Form vorliegt, bleibt unklar. Möglicherweise repräsentiert diese Cbs1p-Form auch die bereits beschriebenen, mit hohen TDC-Konzentrationen nicht solubilisierbaren Aggregate, die bei Überexpression von Cbs1p in Mitochondrien auftreten (Michaelis, 1991). Da sich ein offensichtlich geringerer Grad an Überexpression von Cbs1p (authentischer Promotor und multi-copy Plasmid) nicht auf die Löslichkeit von Cbs1p in wt-Mitochondrien auswirkt (s. 3.2.2.2.4), kann angenommen werden, dass die Ergebnisse der Löslichkeitskonversion in *rho*⁰-Mitochondrien nicht auf die Überexpression zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang sind auch die Befunde der Löslichkeit der C-terminal verkürzten Cbs1p-Derivate interessant, die ebenfalls nicht durch die alkalische Behandlung solubilisiert werden konnten (s. 3.2.2.2.3).

Demgegenüber verändert sich die Löslichkeit von Cbs1p nicht, wenn die Art der Kohlenstoffquelle im Kultivierungsmedium variiert wird. Vergleichende Analysen unter reprimierenden Bedingungen, bei Anwesenheit von Glucose, Wachstum auf Raffinose oder obligat respiratorischer Verwertung von Lactat geben keine Hinweise auf eine amphitropische Natur von Cbs1p. Ein derartiger Wechsel der Protein-Lokalisierung in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle könnte die Möglichkeit eröffnen, die Bildung bzw. Assemblierung der Komplexe der Atmungskette - hier speziell von Komplex III - entsprechend den physiologischen Anforderungen zu adaptieren. Für ein mitochondriales cAMP-bindendes Protein konnte beispielsweise eine amphitrophische Natur nachgewiesen werden (Müller and Bandlow, 1989a; 1989b; 1989c). In diesem Fall wird das Protein durch Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung und eine Phospholipid-aktivierte Phospholipase von der Membran gelöst (Müller and Bandlow, 1989c).

Die Isolierung eines mit Cbs1p interagierenden Proteins könnte beispielsweise durch eine Co-Immunopräzipitation mit vorausgehender Solubilisierung mit TDC erbracht werden.

Sind die hydrophoben C-terminalen Bereiche von Cbs1p an der Membranassoziation beteiligt?

Der Hydropathie-Plot von Cbs1p weist nur im C-terminalen Bereich des maturen Proteins Cluster nennenswerter Hydrophobizität auf (vgl. Abb. 6). Ausgehend von dem Befund, dass sich Cbs1p wie ein integrales Membranprotein verhält (Michaelis *et al.*, 1991), wurde der Einfluss auf die Löslichkeit von Deletionen der hydrophoben Segmente im C-terminalen Drittel des Proteins untersucht (s. 3.2.2.2.3). Überraschenderweise änderte sich das Löslichkeitsverhalten gegenüber Hochsalz und alkalischem pH-Wert in unerwarteter Form. Während das wt-Protein unter alkalischen Bedingungen vollständig solubilisiert werden kann, co-sedimentiert C-terminal trunkiertes Cbs1p zum überwiegenden Teil mit der Membran-Fraktion. Dabei ist es unbedeutend, ob eines der beiden hydrophoben Segmente oder beide gleichzeitig deletiert wurden (s. Abb. 12). Offensichtlich verhindern die C-terminalen Deletionen die periphere Membranassoziation von Cbs1p und führen somit zu einem nicht funktionellen Protein. Das unterstützen auch die Analysen zum Komplementationsverhalten dieser verkürzten Cbs1p-Derivate, wonach diese nicht in der Lage sind, das wt-Protein in der *cbs1*-Nullmutante funktionell zu ersetzen (s. 3.3.2.2).

Worauf könnte die veränderte Art der Löslichkeit beruhen?

Durch die Deletionen könnte die native Faltung von Cbs1p beeinträchtigt sein, so dass sekundär die für das wt-Protein beschriebene Membranassoziation (s. oben) nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Des weiteren ist vorstellbar, dass durch die Entfernung der hydrophoben Cluster eine andere Art der Membranassoziation induziert wird, beispielsweise eine Lipidanker-vermittelte. Für das wt-Protein würde das bedeuten, dass es neben der peripheren Assoziation noch eine weitere - Carbonat-resistente - Verankerung, gibt, die unter bestimmten physiologischen Bedingungen induziert wird.

Durch die Manipulationen am C-terminalen Bereich könnten somit wichtige Bereiche betroffen sein, die Vermittler oder Induktor der einzelnen Assoziationsformen darstellen könnten. Allerdings geben die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Löslichkeit einer C-terminalen Deletionsmutante von der Aktivität verschiedener

Phospholipasen keine Hinweise auf eine Lipidanker-vermittelte Membranständigkeit (s. 3.2.2.2.3). Darüber hinaus spricht der Befund einer unveränderten Löslichkeit von Cbs1p beim Wachstum der Zellen auf Medien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen gegen diese Vorstellung.

Ein ähnliches Phänomen hinsichtlich der Veränderung der Löslichkeit wurde für Cytochrom c_1 (Cyt1p) beschrieben (Hase *et al.*, 1987). Eine Deletionsmutante von Cyt1p, die nicht mehr über den authentischen Membrananker verfügt, besitzt eine vom wt-Protein unterscheidbare Löslichkeit. Die Autoren finden das Mutantenprotein in einer Carbonat-resistenten Form, das schwerer durch Detergenzien zu lösen ist als das ebenfalls Carbonat-resistente wt-Protein. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass dieses Mutantenprotein nicht mehr mit Komplex III assoziiert vorliegt, sondern über eine veränderte topologische Ausrichtung und Lokalisierung verfügt. Möglicherweise können Proteine, die nicht mehr in der Lage sind, ihre authentische Faltung und die funktionelle Position einzunehmen, neben dem proteolytischen Abbau auch in Protease-resistenten Strukturen oder Aggregaten akkumulieren, die sich - zumindest im Fall von Cbs1p Δ (193-204) - auch als resistent gegenüber der alkalischen Extraktion erweisen.

Bei den vorangegangenen Betrachtungen wurde bislang außer acht gelassen, dass die Cbs1p-Derivate über einen 3fachen-HA-tag am C-Terminus verfügen. Zwar interferiert der HA-tag nicht mit der Funktion des wt-Proteins (s. 3.2.2.2.1), aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das unerwartete Löslichkeitsverhalten der Deletionsmutanten auf diesen Epitop-tag zurückzuführen ist. Denkbar wäre beispielsweise eine Akkumulation des Proteins durch Beeinträchtigung des proteolytischen Abbaus infolge der zusätzlichen As am C-Terminus.

Interessanterweise konnte eine Carbonat-resistente Cbs1p-Form unter drei verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden: zum einen in ρ^0 -Zellen, zum anderen bei C-terminal deletiertem Cbs1p und bei Überexpression in Mitochondrien (Michaelis *et al.*, 1991). Zwischen den hier aufgeführten Fällen könnte folgender Zusammenhang bestehen. In allen drei Fällen könnte es auf verschiedenen Wegen zur Aufhebung der für die periphere Membranassoziation von Cbs1p möglicherweise essentiellen Protein-Protein-Interaktion mit einem integralen Membranprotein kommen. In den Mitochondrien eines ρ^0 -Stammes könnte der Interaktionspartner

fehlen. Durch die Deletionen im C-terminalen Bereich wird möglicherweise der für die Bindung wichtige Abschnitt des Proteins entfernt oder sekundär die Interaktion durch Auswirkungen auf die Faltung verhindert. Bei der Überexpression könnte der Bindungspartner austitriert werden, sodass ein Überschuss an ungebundenem Protein akkumuliert.

Die Befunde zur veränderten Löslichkeit der Cbs1p-Deletionsmutanten lassen vermuten, dass der C-terminale hydrophobe Bereich des Proteins, genauer zwischen den As 193-228, eine Rolle bei der Vermittlung der authentischen Membranständigkeit von Cbs1p spielt. Der hydrophobe Stretch könnte matrixseitig in die Lipidschicht eintauchen und dort mit den Kohlenwasserstoff-Ketten der Lipidmoleküle interagieren. Eine derartige Membranverankerung wurde beispielsweise für die Untereinheit 8 des Komplexes III postuliert. Allerdings kann dieses Protein - im Gegensatz zu Cbs1p - nicht durch alkalische Behandlung solubilisiert werden (Boumans *et al.*, 1996). Für Tim44p, ein peripheres Membranprotein der Translokationsmaschinerie der inneren Mitochondrienmembran, wurden biophysikalische Analysen der Membranassoziation durchgeführt (Weiss *et al.*, 1999). Die Autoren schlussfolgern, dass Teile des Proteins die polaren Kopfgruppen des Lipidbilayers penetrieren und mit dem hydrophoben Anteil der Phospholipide interagieren. Diese Bindung wird selbst in Anwesenheit von 1 M NaCl nicht aufgehoben. Auch Cbs1p wird unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl) nicht vollständig aus der Membran gelöst. Unter diesem Aspekt könnte auch für Cbs1p eine vergleichbare Assoziation für Cbs1p angenommen werden.

Letztlich besteht die Möglichkeit, dass der hydrophobe C-Terminus zwar für ein Eintauchen in die Membran verantwortlich ist, die Bindung aber mit intrinsischen Proteinen stattfindet. Für die letzte Vermutung spricht die Beobachtung, dass die hydrophoben Bereiche weder durch einen artifiziellen noch durch heterologe Transmembranbereiche substituiert werden können. Wären die C-terminalen Segmente *per se* auf Grund ihrer Hydrophobizität zur Membranbindung befähigt, so sollten auch die substituierten Membrananker die Funktion der Deletionsmutanten wieder restaurieren können. Wie unter 3.2.2.1 beschrieben, können allerdings diese Substitutions-Chimären das wt-Protein funktionell nicht ersetzen. Das impliziert, dass der hydrophobe Charakter nicht hinreichend für ein funktionsfähiges Protein ist.

Möglicherweise beinhalten die deletierten Bereiche weitere Determinanten, wie z.B. Bereiche einer Protein-Wechselwirkung. Zum selben Schluss führten sowohl die oben angeführte Auswertung der Daten zur Löslichkeit des wt-Proteins als auch die Analyse des veränderten Löslichkeitsverhaltens der C-terminalen Deletionsmutanten.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Daten zur Membranassoziation des Rieske-Proteins in Rinder-Herz-Mitochondrien. Diese Untereinheit des Komplexes III kann durch alkalische Behandlung von der Membran gelöst werden (Gonzalez-Halphen *et al.*, 1991). Die Autoren vermuten, dass das peripher assoziierte Rieske-Protein über hydrophobe Protein-Interaktionen an Untereinheiten des Komplexes III bindet und dass ein 18 As langer nicht-transmembraner amphipathischer Bereich des Proteins für die Bindung verantwortlich ist. Auch für das Rieske-Protein in *S. cerevisiae*, Rip1p, wurde die Assoziation über hydrophobe Protein-Wechselwirkungen mit dem Komplex III bestätigt (Szczepaniak *et al.*, 1995). Prinzipiell ist auch für Cbs1p eine derartige Assoziation vorstellbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cbs1p ein matrixseitig fest peripher membranassoziiertes Protein der inneren Mitochondrienmembran ist. Der C-terminale hydrophobe Bereich ist dabei möglicherweise in die Membranassoziation involviert, wobei die experimentellen Befunde dafür sprechen, dass nicht der hydrophobe Charakter allein, sondern Protein-Protein-Interaktionen, vermittelt durch dieses Segment, für die Verankerung verantwortlich sind.

4.3 Mutagenese von CBS1

Für die mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren der Hefe-Mitochondrien wurden bis vor kurzem noch keine homologen Proteine in phylogenetisch weiter entfernten Organismen gefunden. Für die nah verwandte Art *S. bayanus* konnten durch cross-Hybridisierung die Homologen der COX3-Translationsfaktoren sowie von Pet111p detektiert werden (Costanzo *et al.*, 2000a). Durch einen komplett anderen Screening-Ansatz konnten inzwischen auch Homologe in *S. kluyveri* (Pet111p, Pet122p) und *Kluyveromyces (K.) lactis* (Pet111p) isoliert werden. Dieser Ansatz beruht auf der Komplementation von Mutationen in hoch konservierten Genen, die *PET111* bzw.

PET122 flankieren, und basiert auf der Annahme, dass die Anordnung der Gene phylogenetisch erhalten bleibt (Costanzo *et al.*, 2000a). Die Autoren geben für die Identität zwischen ScPet111p und den Pet111p-Orthologen der verschiedenen Knospen-Hefen ca. 80 % für die nah verwandte Art *S. bayanus*, ca. 30 % für *S. servazzii* und 20 % für *K. lactis* an. Daraus ist ersichtlich, dass die mitochondrialen Translationsaktivatoren der Hefe zu einer Gruppe von hoch divergierenden Proteinen gehören. Dieser Umstand macht es schwierig, auf der Grundlage von Homologien essentielle Proteinbereiche zu identifizieren.

Für Cbs1p oder Cbs2p fehlt bislang der Nachweis homologer Proteine in anderen Organismen. Im Fall von *CBS1* wurde in Anlehnung an das Screening-System zur Suche nach Orthologen (Costanzo *et al.*, 2000a) versucht, über das 5'-gelegene COX9-Gen mittels Datenbank-Suche Zugang zu flankierenden Sequenzen in anderen Organismen zu erhalten, die möglicherweise Identitäten zu Cbs1p aufweisen. Dazu wurden die COX9-homologen Sequenzen und die flankierenden Bereiche von *S. pombe* aus der Datenbank (Sanger Center; <http://www.sanger.ac.uk>) unter diesem Gesichtspunkt untersucht. Unter den COX9 flankierenden ORFs konnte keiner identifiziert werden, dessen kodiertes Protein einen vergleichbaren Grad an Identität zu Cbs1p aufweist, wie er beispielsweise für das *K. lactis*-Orthologe zu Pet111p gefunden wurde.

Auch bei einer Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen auf der Grundlage des Hydropathie-Profiles von Cbs1p und einer Hydropathie-Profil-Datenbank konnten keine Proteine identifiziert werden [Protein Hydrophilicity/Hydrophobicity Search and Comparison Server; Weizmann Institute of Science, <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/index.html>]. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass selbst zwischen den mRNA-spezifischen Translationsaktivatoren der Hefe-Mitochondrien keine erkennbaren Gemeinsamkeiten, weder hinsichtlich Primärsequenz oder Sequenzmotiven noch auf der Ebene der Sekundärstruktur oder der Hydropathie-Profile, bestehen.

Darüber hinaus konnte beim Vergleich der Cbs1p Primärsequenz gegen Proteinmotiv-Bibliotheken (e-motif-search) nur ein Motiv ([ilmv]p...gl.ss[as]: GHMP_Kinase ATP-binding domain) identifiziert werden, dessen Auftreten in Cbs1p signifikant unterhalb des statistischen Erwartungswertes der relativ kurzen Sequenzmotive lag. Der Austausch des hoch konservierten Prolins(173) innerhalb des putativen Cbs1p-Motives gegen Glutamin führte jedoch nicht zum Funktionsausfall des Proteins bei permissiver Temperatur (s. 3.3.2.1). Das Mutantenprotein konnte das wt-Protein in der Nullmutante jedoch bei einer Wachstumstemperatur von 37°C nicht ersetzen. Dies impliziert, dass der Prolinrest zwar wichtig für die Funktion ist, jedoch möglicherweise nicht als Bestandteil einer ATP-Bindungsdomäne fungiert. Man würde erwarten, dass der Austausch einer hoch konservierten As gegen eine As mit anderen physikochemischen Eigenschaften zu einem Ausfall der Motiv-vermittelten Funktion führt. Zudem besitzen Proteine mit dieser Motiv-Signatur - im Gegensatz zu Cbs1p - weitere gemeinsame Domänen, die offensichtlich im Konzert die ATP-Bindung vermitteln.

Um für die Funktion von Cbs1p funktionell wichtige As oder Bereiche zu identifizieren, wurde *CBS1* mutagenisiert. Dabei sollte zunächst eine mittels „random“-Mutagenese kreierte Schar von Cbs1p-Mutanten hinsichtlich ihrer Komplementationsfähigkeit der *cbs1*-Nullmutante charakterisiert werden (s. 3.3.1). Neben einer Reihe von Stopp-Mutationen, die zu nicht funktionstüchtigen Proteinen führen und die Bedeutung des C-terminalen Bereiches belegen, konnten vor allem Mutationen zwischen den As 100 und 135 identifiziert werden. Der As-Austausch K(102)R beeinträchtigt die Cbs1p-Funktion beträchtlich. Offensichtlich ist die As Lysin an dieser Position eine absolute strukturelle Bedingung, da durch den Austausch gegen Arginin die Ladung erhalten bleibt. Die Substitution G(104)D aus dem originalen *cbs1-1* Allel resultiert in einem kompletten Ausfall der Cbs1p-Funktion. Interessanterweise wird für den flankierenden Sequenzbereich eine Homologie zu einem FAD Pyridin-Nukleotid-Reduktase Motiv III ([ilv]g..[filvy][iv]..e[filmv], e-motif-search) vorhergesagt, wobei das mutierte Glycin(104) einer konservierten As des Motivs entspricht. Allerdings ist dieses nur eines von insgesamt fünf Motiven, die in ihrer Gesamtheit charakteristisch für Proteine dieser Klasse sind. Da die partikuläre Funktion des Motivs unbekannt ist, können keine Hinweise für die Cbs1p-Funktion abgeleitet werden.

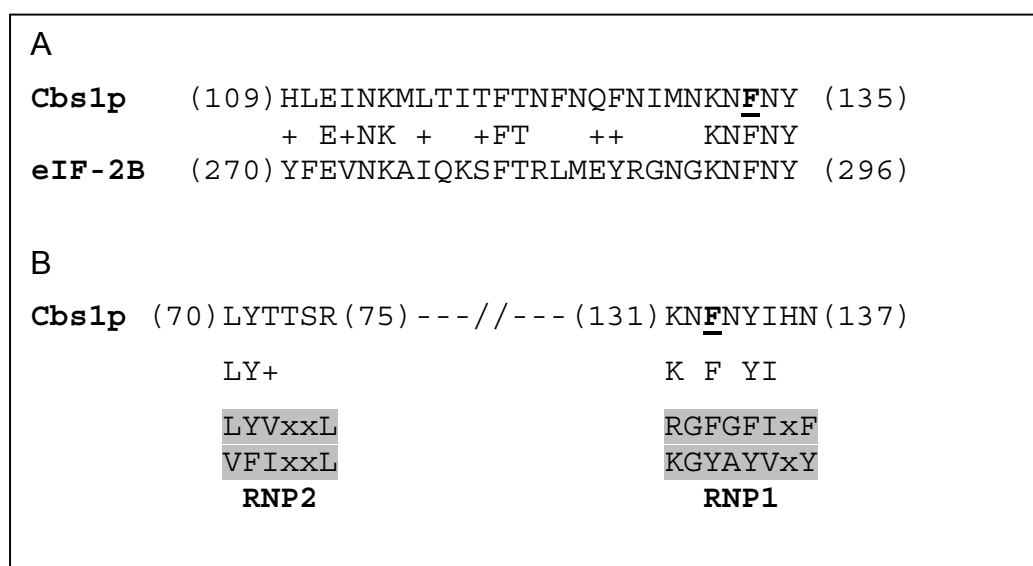


Abb. 32: **Sequenz-Alignments von Cbs1p mit eIF-2B bzw. der RNP1- und RNP2-Konsensus-Sequenz**

(A) Das Alignment der As 109-135 von Cbs1p und der As 270-296 von eIF-2B wurde mit Hilfe des BLAST-Programmes (Altschul *et al.*, 1990) erstellt. (B) Die Bereiche der As 70-75 bzw. 131-135 von Cbs1p wurden mit den Konsensus-Sequenzen der RNA-Bindedomänen-Motive RNP1 und RNP2 verglichen. Die Position der Mutation F(133) ist hervorgehoben.

Der Austausch von F(133) gegen S bzw. Y führt ebenfalls zum Verlust der Komplementationsfähigkeit. Der durch die Mutation betroffene Proteinbereich bietet in zweierlei Hinsicht interessante Interpretationsaspekte.

Zum einen wird er im Zusammenhang mit einer potentiellen RNA-Bindung aufgrund der Homologie zu einem RNA-Binde-Motiv diskutiert (Körte, 1989), und andererseits besitzt dieser Bereich Homologie zu einem 27 As langen Segment des putativen Translations-Initiationsfaktors eIF-2B aus *Caenorhabditis elegans* (37 % Identität, 59 % Homologie; Abb. 32).

Eine typische RNA-Bindedomäne (RBD) besteht aus 80 bis 90 As mit zwei kurzen Konsensus-Sequenzen, RNP2 (6 As) und RNP1 (8 As), die in dieser Reihenfolge separiert durch ca. 40 As vorliegen (Bandziulis *et al.*, 1989; Burd and Dreyfuss, 1994; Inoue *et al.*, 1997). An der Bindung der RNA ist ein konserviertes Paar aromatischer As involviert, wobei eine As in RNP1 und eine in RNP2 lokalisiert ist (Inoue *et al.*, 1997).

Das Segment zwischen den As 131-136 von Cbs1p besitzt einige Homologie zu einer RNP1-Bindedomäne (Abb. 32), wobei möglicherweise F(133) die aromatische As darstellen könnte, die an der RNA-Bindung beteiligt ist. Das wäre auch eine Erklärung für den beobachteten totalen Funktionsaufall bei Substitutionen an dieser As-Position. Eine zweite, N-terminal gelegene Sequenz, die einem RNP2-Konsensus entspricht, könnte im Bereich der As 70-75 liegen (Abb. 32).

Dabei könnte es sich bei Y(71) um die bereits beschriebene zweite aromatische As handeln, die als Partner für die RNA-bindung essentiell ist. Wie aus einer Analyse von RNP1/2- Sequenzen von 161 RBD-Homologen hervorgeht (Inoue *et al.*, 1997), wurde die 1. Position des Motivs in 99 % der Fälle durch eine aliphatische As (oft die As L) besetzt, benachbart durch eine aromatische As in 83 % der Fälle. Somit könnte L(70) die hoch konservierte aliphatische As im putativen RNP2-Motiv von Cbs1p darstellen. Für die Belegung der As-Positionen 3 und 6 des Motives wurden in 96 % bzw. 98 % der Fälle aliphatische As nachgewiesen. T(72) mit einer aliphatischen Hydroxyl-Seitenkette könnte diese Position in Cbs1p markieren. Die letzte (6.) Position des putativen Cbs1p-Motivs nimmt allerdings eine basische As R(75) ein. Die übrigen As von RNP2 zeigen einen weniger konservierten Charakter.

Möglicherweise ist der hier diskutierte Bereich von Cbs1p in Protein-RNA-Wechselwirkungen involviert und könnte damit eine Region präsentieren, die mit dem Leader der COB-mRNA im Bereich von -170 bis -104 oder zwischen -60 und -33 relativ zum A[+1]TG von Exon 1 interagiert (Mittelmeier and Dieckmann, 1995). Für ein RNA-bindendes Potential dieser Region spricht auch die Homologie zu einer Maturase (U58574) aus *Perideridia gairdneri* (48 % Identität über 31 As, Position 105-135). Darüber hinaus besitzt ein Hitzeschockprotein (Hsp22p; *Rickettsia prowazekii*) Homologie zu diesem Segment (46 % Identität über 32 As, Position 127-158).

Analysen zur RNA-Bindung von Cbs1p durch Gelshift-Experimente werden zur Zeit durchgeführt (C. Deumer, pers. Mitteilung) und sollten unter Einbezug der Mutanten F(133)S bzw. F(133)Y ergänzt werden. Darüber hinaus könnten Substitutionen der As L(70) bzw. Y(71) Hinweise auf eine Beteiligung an der RNA-Bindung geben.

Zwei weitere Mutationen, die zum Totalausfall der Proteinfunktion führen, befinden sich an den As-Positionen N(189) und N(210). Überraschend ist, dass diese As auch innerhalb eines Homologie-Stretches zu Cbt1p konserviert sind. Dieser homologe Bereich erstreckt sich zwischen den As 178 bis 212 bezüglich Cbs1p und besitzt 40 % identische bzw. 51 % chemisch ähnliche As (Abb. 33). Aufgrund der Funktion von Cbt1p, die Prozessierung des 3'-Endes der *COB*-mRNA (Rieger *et al.*, 1997), lässt sich spekulieren, dass dieser Bereich möglicherweise spezifisch für die gemeinsame Ziel-mRNA ist oder aber mit der Verknüpfung von Prozessierung und Translation der *COB*-mRNA in Beziehung steht.

Cbs1p	(178)	LTSSSNDFQNL	<u>N</u>	DWKVILSFIGY	LKLL	EIKND	<u>N</u>	NKK	(212)
		L	SS	++NLN	W		KLL+I	+NKK	
Cbt1p	(200)	LEESSRMYRNL	NYW	-----	KLLKIARN	NKK			(224)

Abb. 33: **Homologievergleich von Cbs1p (As 178-212) und Cbt1p (As 200-224)**
Die Positionen der Mutationen N(189) und N(210) sind hervorgehoben.

Bei der Betrachtung des Sequenz-Alignments (Abb. 33) fällt eine 10 As lange Lücke auf, die allerdings durch Blöcke identischer As flankiert ist. Diese Lücke im Cbt1p deckt sich mit dem proximalen hydrophoben Bereich von Cbs1p (As 193-104), der bereits im Rahmen der Membranassoziation diskutiert wurde und essentiell für die Cbs1p-Funktion ist. Falls diese Homologie tatsächlich einen Zusammenhang *in vivo* repräsentiert, so sind die Bereiche identischer As in Cbt1p offenbar nicht im Kontext mit der Membran für die Funktion notwendig.

Werden die Hydropathie-Profile der beiden Proteine verglichen, so ist bemerkenswert, dass sowohl im N-terminalen als auch im zentralen Teil der Proteine eine vergleichbare Dynamik der Hydrophobizität existiert (Abb. 34).

Ob diese Gemeinsamkeiten im Hydropathie-Profil auch Konsequenzen hinsichtlich der Funktion beider Proteine besitzen, ist unklar.

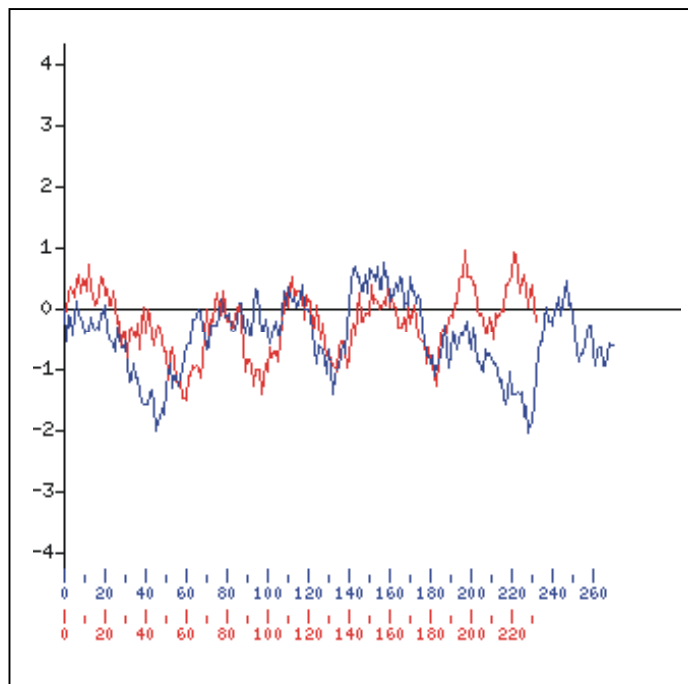


Abb. 34: **Vergleich der Hydropathie-Profile von Cbs1p (rot) und Cbt1p (blau)**

Die Plots wurden mit Hilfe des Kyte&Doolittle-Algorithmus (Kyte and Doolittle, 1982) erstellt und verglichen. Die Zahlen geben die As-Positionen für Cbt1p (oben) und Cbs1p (unten) an.

Hingegen divergieren die Plot-Kurven im C-terminalen Abschnitt der Proteine. Während Cbs1p zwischen As 190 und 228 die beiden bereits erwähnten hydrophoben Segmente ausbildet (s. 3.2.1.2), ist in diesem Bereich bei Cbt1p ein stark hydrophiler Charakter ausgeprägt. Falls der C-terminale Bereich bei Cbs1p in die Membranverankerung involviert ist, so kann man annehmen, dass Cbt1p - wenn überhaupt - über eine andere Art der Membranassoziation verfügt.

4.3.1 Mutagenese des C-terminalen Segmentes von *CBS1*

Der C-terminale Bereich von Cbs1p weist einige strukturelle Besonderheiten auf. Neben den beiden schon erwähnten hydrophoben Segmenten, die durch einen hydrophilen Abschnitt unterbrochen sind, befindet sich ein Cluster positiver Ladungen am extremen C-Terminus. Die starke Beeinträchtigung bereits bei Entfernung der distalen 5 As (darunter 4 positiv geladene As) und der Totalausfall der Cbs1p-Funktion bei weiteren Verkürzungen um 12, 19 bzw. 42 As belegen die funktionelle Bedeutung des C-terminalen Bereiches.

Interessanterweise können die positiv geladenen As am extremen C-Terminus sowohl durch andere positiv geladene als auch negativ geladene As ersetzt werden, ohne dass die Funktion von Cbs1p beeinträchtigt wird. Auch Mutantenproteine mit kompletter Substitution der terminalen 5 As durch 5 Glutaminreste können das wt-Protein funktionell ersetzen. Offensichtlich ist keine der As am extremen C-Terminus auf Grund ihres chemischen Charakters für die Struktur und/oder Funktion essentiell, sondern der gesamte Bereich fungiert als Einheit zur Aufrechterhaltung der Cbs1p-Funktion. Beispielsweise ist vorstellbar, dass er die Stabilität des Proteins determiniert. Das C-terminal verkürzte Cbs1p könnte möglicherweise verstärkt proteolytisch abgebaut werden, oder die Konformation könnte nicht mehr stabil aufrecht erhalten werden. Im Fall der Succinatdehydrogenase-Untereinheit 4 (Sdh4p) ist der Carboxyl-Terminus für die Stabilität des Enzyms notwendig (Oyedotun and Lemire, 1997). Für den Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) konnte gezeigt werden, dass C-terminale Deletionen für die strukturelle Stabilität verantwortlich sind (Kruttscham et al., 1997).

Die Deletionen der hydrophoben Bereiche (As 193-204 bzw. 215-228) führen zum Funktionsverlust des Proteins. Erstaunlicherweise können hydrophobe As des distalen Bereiches ohne Funktionsbeeinträchtigung durch hydrophile As ersetzt werden. Somit scheint der hydrophobe Charakter dieses Segmentes nicht essentiell zu sein. Diese Schlußfolgerung wird durch weitere Punktmutationen bestätigt. So kann das Cystein(222) durch eine Reihe physikochemisch unterschiedlicher As substituiert werden, ohne die Funktion zu beeinflussen. C(222) ist offensichtlich weder in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert noch Bestandteil eines katalytisch aktiven Bereiches.

Damit kann angenommen werden, dass sich die putative stabilisierende Rolle des extremen C-Terminus auch noch auf die angrenzenden As (As 222-228) ausdehnt. Ein Hinweis darauf, dass nicht die einzelne As von Bedeutung ist, sondern ein Segment bestimmter Länge vorhanden sein muss, gibt die Untersuchung der Doppeldeletions-Mutante C(222) und I(223). Im Gegensatz zu den Einzelsubstitutionen führt die Deletion beider As zu einem Protein, das das wt-Protein bei 23°C und 30°C nur teilweise bzw. bei 37°C nicht mehr ersetzen kann.

Eine funktionelle Zuordnung von C-terminalen Proteinbereichen von Cbs1p konnte auch durch immunologische Nachweise von Untereinheiten des Komplexes IV (Cox1p, Cox2p und Cox3p) und von Komplex III (Rip1p und Cyt1p) in Mitochondrien-Lysaten der entsprechenden C-terminalen Deletionsmutanten nicht getroffen werden. Alle untersuchten Mutanten mit Deletionen der einzelnen hydrophoben Segmente (As 193-204 bzw. 215-228) bzw. des gesamten C-terminalen Bereiches (As 192-233) zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der „steady state“-Konzentration der untersuchten Untereinheiten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dem distalen hydrophoben Bereich und dem extremen C-Terminus möglicherweise eine Rolle in der proteolytischen und/oder strukturellen Stabilität zukommt, wohingegen der proximal gelegene hydrophobe Bereich an der Assoziation von Cbs1p mit der Membran beteiligt sein könnte.

4.3.2 Mutagenese des N-terminalen Segmentes von CBS1

Die ersten 29 As von Cbs1p werden beim Import in die Mitochondrien abgespalten (Körte *et al.*, 1989). Das impliziert, dass es sich bei diesem Protein-Segment um eine mitochondriale Importsequenz handeln könnte.

Überraschenderweise wird jedoch Cbs1p unter authentischer Expression ohne die aminoterminalen 29 As (Cbs1p Δ (1-29)) ebenfalls in die Mitochondrien importiert und kann das wt-Protein vollständig ersetzen (Krause-Buchholz *et al.*, 2000). Demnach ist die abspaltbare Präsequenz nicht essentiell für den mitochondrialen Import. Das reife Protein besitzt offensichtlich hinreichend Informationen für das mitochondriale Targeting.

Ähnliche Befunde wurden bereits für andere mitochondriale Proteine beschrieben, z.B. für die Untereinheit 6 des Cytochrom *bc₁*-Komplexes (DeLabre *et al.*, 1999) und für den Phosphatcarrier aus Säugermitchondrien (Zara *et al.*, 1992). Im letzteren Fall wurde gezeigt, dass die Präsequenz die Spezifität und Effizienz des Imports erhöht. Wird Cbs1p Δ (1-29) überexprimiert (multi-copy; *ADH1* Promotor), so führt das zu keinem veränderten Komplementationsverhalten.

Im Gegensatz dazu interferiert die Überexpression des wt-Proteins mit der Funktionalität des Proteins und führt zu einem reduzierten Wachstum der Nullmutante auf Glycerinmedium. Möglicherweise wirken sich die schwer löslichen Aggregate, die bei der Überexpression von Cbs1p entstehen (Michaelis, 1991), negativ auf die mitochondrialen Funktionen aus. Da dieser Effekt nur in Anwesenheit der abspaltbaren Präsequenz beobachtet werden kann, lässt sich vermuten, dass die As 1-29 von Cbs1p - ähnlich der Präsequenz des Phosphatcarriers (s. oben) - die Effizienz des Imports erhöhen und es so zur intramitochondrialen Akkumulation von Cbs1p kommt.

Ein weiterer Beleg dafür, dass das N-terminal verkürzte Cbs1p über eine mitochondriale Targeting-Information verfügen muss, liefert ein im Rahmen der Two Hybrid-Analysen hergestelltes Gal4pBD::Cbs1p(30-233) Fusionsprotein. Dieses ist überraschenderweise in der Lage, eine *cbs1*-Nullmutante zu komplementieren, und muss daher zumindest in geringer Konzentration das mitochondriale Kompartiment erreichen. Immunologisch konnte nachgewiesen werden, dass dieses Fusionsprotein ohne Prozessierung in die Mitochondrien importiert wird (s. 3.3.2.4). Demgegenüber können die Gal4pBD-Fusionen mit dem N-terminalen Bereich (As 30-146) bzw. mit dem C-terminalen Segment (As 147-233) von Cbs1p nicht in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass die mitochondriale Targeting-Information in diesen Chimären nicht mehr verfügbar ist. Entweder handelt es sich um eine zwei- oder mehrteilige Signalsequenz, oder diese ist durch die willkürliche Teilung des Proteins zerstört. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Nicht-Detektierbarkeit der chimären Proteine auf proteolytischen Abbau zurückzuführen ist.

Die meisten Kern-kodierten mitochondrialen Proteine werden mittels einer N-terminalen Präsequenz importiert. Es gibt aber eine Reihe von mitochondrial adressierten Proteinen, die über interne Targetsignale (z.B. Cytochrom c-Hämlyase, (Diekert *et al.*, 1999)) verfügen. Tim23p, eine essentielle Komponente der Importmaschinerie der inneren Mitochondrienmembran, verfügt ebenfalls über interne Importsignale, wobei das Protein durch zwei hydrophobe Bereiche an die Mitochondrien dirigiert wird und positiv geladene Loop-Strukturen für die Insertion in die innere Membran verantwortlich sind (Davis *et al.*, 1998).

Im Fall der mitochondrialen DNA Helicase (Hmi1p) ist eine abspaltbare C-terminale Präsequenz für den Import verantwortlich.

In welchem Bereich von Cbs1p könnte die Targeting-Information lokalisiert sein?

Im Rahmen von Analysen zur subzellulären Verteilung der β -Galaktosidase-Enzymaktivität eines Fusionsproteins, bestehend aus den 140 aminoterminalen As von Cbs1p und der β -Galaktosidase, co-fraktionierte der überwiegende Anteil der enzymatischen Aktivität mit der mitochondrialen Fraktion (Forsbach, 1989). Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen nicht gezeigt, dass das Fusionsprotein in den Mitochondrien (Proteinase K-geschützt) vorlag.

Andererseits wird ein C-terminal um 34 As trunkiertes Protein *in vitro* nicht in die Mitochondrien importiert (Körte *et al.*, 1989). Gegen eine ausschließliche Lokalisierung des Importsignals innerhalb der C-terminalen 42 As von Cbs1p spricht jedoch der immunologische Nachweis der C-terminal trunkierten Cbs1p-Derivate im mitochondrialen Kompartiment (s. 3.2.2.2.1).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die As 76-233 von Cbs1p *in vitro* nicht importiert werden (Körte *et al.*, 1989). Aus den Daten ergibt sich somit, dass Cbs1p neben der abspaltbaren Präsequenz möglicherweise auch im Bereich der As 30-76 eine Targeting-Information besitzt.

Allerdings konnte, wie oben beschrieben, das Gal4pBD-Fusionsprotein mit den As 30-146 von Cbs1p, welches diesen Bereich enthält, nicht in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der Import von Cbs1p, basierend auf der zusätzlichen Targeting-Information, bei *in vitro*-Importexperimenten gestört, sodass der Transport in die Mitochondrien nur über die abspaltbare Präsequenz erfolgen kann. Denkbar ist beispielsweise, dass sich die Importwege, vermittelt durch die Präsequenz bzw. die putative interne Importsequenz, unterscheiden, und letztere *in vitro* durch das Fehlen eines Co-Faktors inaktiv ist.

Interessanterweise findet sich innerhalb der As 30-76 ein Segment, welches möglicherweise eine amphipathische Helix ausbilden könnte. Entsprechend der „helix-wheel“-Projektion der As 30-44 (Abb. 35) könnte es zur Clusterung von hydrophoben As auf der einen und zur Ansammlung positiver Ladungen auf der Gegenseite der Helix kommen.

Computergestützte Analysen der Sekundärstruktur (s. Abb. 5) sagen allerdings nur für einen Teil des betrachteten Bereiches (As 40-44) eine helikale Faltung vorher. Möglicherweise bewirkt jedoch die Deletion der authentischen Präsequenz eine helikale Faltung der nun N-terminal exponierten Proteinbereiche. Zudem wird durch die Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur nicht berücksichtigt, dass sich dieser Bereich erst in der Membran oder in membranähnlicher Umgebung α -helikal falten muss (von Heijne, 1986).

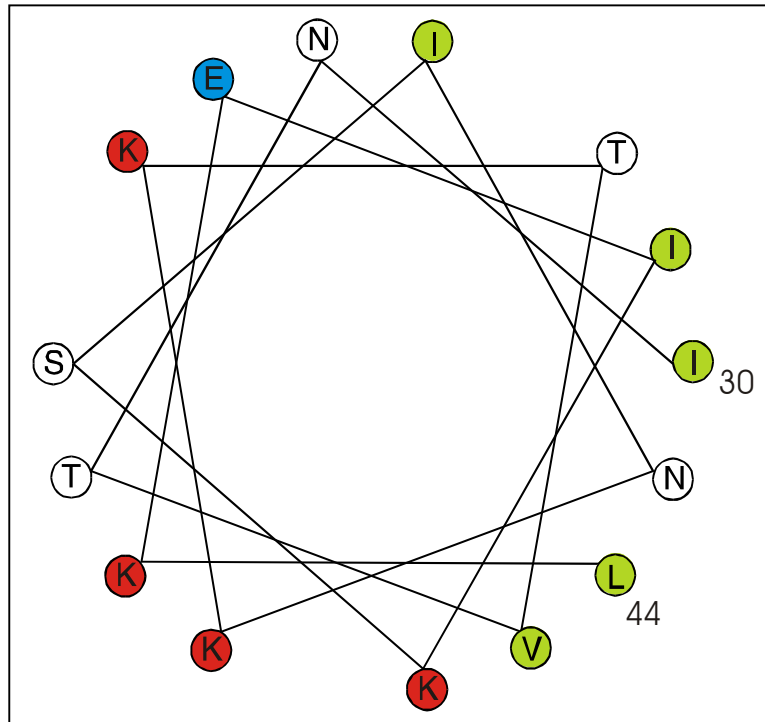


Abb. 35: „Helical-wheel“-Projektion der As 30-44 von Cbs1p

Die Projektion wurde mit Hilfe des Programmes „Helical Wheel Custom Images and Interactive Java Applet“ (Fischer, 2000) erstellt. Die As sind im Ein-Buchstabencode angegeben und entsprechend der physikochemischen Eigenschaften farbig unterlegt: grün = hydrophob; rot = positiv geladen, blau = negativ geladen, weiß = ungeladen, polar. Die Positionen der As 30 bzw. 44 sind angegeben.

Die meisten N-terminalen mitochondrialen Targeting-Sequenzen bilden amphiphile α -Helices aus und vermitteln so die Interaktion mit der Importmaschinerie (von Heijne, 1986). Für die Bindung der Präsequenzen an den mitochondrialen Importrezeptor Tom20p ist die hydrophobe Seite der amphipathischen Helix essentiell, wohingegen die positiven Ladungen für den Membranpotential-abhängigen Import notwendig sind (Abe *et al.*, 2000).

Das Cbs1p-Segment zwischen den As 30-44 weist zumindest einige Charakteristika einer mitochondrialen Importsequenz auf. Diese theoretischen Analysen würden - im Einklang mit den Befunden der *in vitro*-Import Experimente - für eine Lokalisierung der zusätzlichen Targeting-Information zwischen den As 30-76 sprechen. Allerdings könnten weitere Bereiche von Cbs1p eine amphipathischen Helix ausbilden, deren Erkennung aufgrund der „Helical-wheel“-Projektion nicht offensichtlich ist.

Einige nicht-amphiphile Helices können sich unter Berücksichtigung der Flexibilität der Aminosäure-Seitenketten dennoch als amphipathisch erweisen (Gavel *et al.*, 1988). Darüber hinaus scheinen die Kriterien für eine mitochondriale Importsequenz nicht sehr stringent zu sein. Dies implizieren die Ergebnisse einer Untersuchung zur Restauration der Importbefähigung (Baker and Schatz, 1987). Die Autoren fusionierten eine zufällige Auswahl an Sequenz-Abschnitten des *E. coli*-Genoms bzw. der Dihydrofolatreduktase an eine trunkierte Cytochrom c Oxidase Untereinheit IV (Cox4p)-Präsequenz. Etwa 2,7 % der mit *E. coli*-Sequenzen fusionierten bzw. 5 % der von der Dihydrofolatreduktase abgeleiteten Sequenzen waren in der Lage, den Import von trunkiertem Cox4p in die Mitochondrien zu vermitteln (Baker and Schatz, 1987).

Genauere Analysen des mitochondrialen Targeting-Potentials verschiedener Cbs1p-Bereiche als Fusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) könnten fluoreszenzmikroskopische Hinweise bzw. Western-analytische Quantifizierungen ermöglichen.

Zusammenfassend betrachtet sind die As 1-29 nicht essentiell für einen mitochondrialen Import von Cbs1p. Cbs1p besitzt wenigstens eine weitere Targeting-Information im maturen Protein, die möglicherweise zwei- oder mehrteilig vorliegt. Die C-terminalen 42 As sind offensichtlich nicht am Import beteiligt.

4.4 Interaktionsanalyse mit dem Two Hybrid-System

Für die Analysen von Protein-Protein-Interaktionen wird das Two Hybrid-System in Hefe seit seiner Einführung (Fields and Song, 1989) in einer Vielzahl von Experimenten mit einer Reihe von Variationen eingesetzt. Prinzipiell beruht der Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion auf der Rekonstitution des Gal4p-Transkriptionsaktivators der Hefe. Die beiden unabhängig voneinander funktionellen Domänen - DNA-Binde-(Gal4pBD) und Aktivator-Domäne (Gal4pAD) - werden durch die physikalische Wechselwirkung der fusionierten Interaktionskandidaten in räumliche Nähe gebracht, um die Transkription eines Reportergenes zu aktivieren.

Die offensichtlichen Vorteile gegenüber biochemischen Methoden liegen vor allem in der schnellen Zugänglichkeit der für ein interagierendes Protein kodierenden Sequenz bei einem Library-Screening, der schnellen Durchführbarkeit einer großen Anzahl von Direkttests mit bekannten Proteinen und der unkomplizierten Identifikation von Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, die Bindung zu vermitteln. Inzwischen wird das System für die genomweite Analyse von Interaktionen aller (vorausgesagten) Proteine der Hefe eingesetzt (Uetz *et al.*, 2000).

Darüber hinaus steht es als *in vivo*-System den physikalischen Methoden gegenüber. Allerdings gibt es eine Reihe von Nachteilen, die den Einsatz des Two Hybrid-Systems einschränken. So bezieht sich *in vivo* auf die Bedingungen im Kern, wo sich Proteine aus anderen Kompartimenten möglicherweise nicht nativ falten können. Da das Two Hybrid-System auf der Aktivierung der Transkription beruht, setzt dies den Import der Gal4pBD- bzw. Gal4pAD-Fusionsproteine in den Kern voraus. Letzteres könnte ein Nachteil für extrazelluläre Proteine oder Proteine mit konkurrierenden - z.B. mitochondrialen - Targeting-Informationen sein (van Crielinge and Beyaert, 1999). Ebenso ist nicht vorhersagbar, inwieweit sich die Fusionspartner gegenseitig in ihrer Konformation beeinflussen.

Das Two Hybrid-System wurde in dieser Arbeit verwendet, um Interaktionspartner für Cbs1p bzw. Cbs2p zu detektieren. Neben dem Beweis, dass die Fusionsproteine von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Gal4pBD funktionell und in der Lage sind, die entsprechenden Nullmutanten zu komplementieren, konnte auch die Kernlokalisierung

des Cbs1p-Fusionsproteins gezeigt werden (s. 3.4.1 und 3.4.4). Somit sind essentielle Voraussetzungen für eine Two Hybrid-Analyse erfüllt.

Trotz einer Vielzahl von Variationen, die zum Ziel hatten, mögliche negative Interferenzen mit der Funktionsweise des Systems zu umgehen, führten die Analysen nicht zum Nachweis einer spezifischen Interaktion der beiden Translationsaktivatoren untereinander bzw. mit anderen Proteinen. Beispielsweise wurde die abspaltbare N-terminale Präsequenz von Cbs1p entfernt, um einer Fehllokalisierung vorzubeugen. Da das mature Protein ebenfalls eine mitochondriale Targeting-Information besitzt (s. 3.3.2.3), wird das Fusionsprotein zwar im Kern nachgewiesen, ein Teil wird jedoch auch in die Mitochondrien importiert.

Bei Cbs2p wurden die ersten 15 As entfernt, die möglicherweise am Import beteiligt sind. In diesem Fall erwiesen sich die N-terminal um 15 As verkürzten Konstrukte im Gegensatz zum „full-length“-Protein als instabil.

Ein weiteres Problem können hydrophobe Bereiche darstellen, die den Import durch die Kernmembran oder die Faltung behindern könnten (van Crielinge and Beyaert, 1999). Um auch diese Möglichkeit auszuschließen, wurden die hydrophoben Cluster im C-terminalen Bereich von Cbs1p deletiert.

Beim Nachweis von Interaktionen der Translationsaktivatoren der COX-mRNA wurde das Two Hybrid-System erfolgreich eingesetzt (Brown *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Aktivierung von *lacZ* als Reportergen gezeigt werden, dass Pet54p mit Pet122p bzw. Pet494p physikalisch interagiert. Interessanterweise führte nur ein N-terminal um 146 As verkürztes Pet494p-Derivat - im Gegensatz zum wt Protein - zum Nachweis einer schwachen Interaktion. Die Autoren begründen dies mit der Präsenz möglicher N-terminaler (abspaltbarer) mitochondrialer Targeting-Informationen. Die Werte für die gemessene Enzymaktivität der β -Galactosidase für die Interaktion von Pet54p und Pet494p betrugen nur ca. $1/100$ der Messwerte für die Interaktion zwischen Pet54p und Pet122p. Über einen Nachweis der Aktivierung eines zweiten unabhängigen Reportergenes wurde nichts publiziert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist allerdings der Nachweis der Aktivierung eines weiteren Reportergenes (z.B. *HIS3*) unerlässlich, um Reportergen-spezifische Aktivierungen auszuschließen.

So bleibt die Frage offen, warum weder bei den cDNA-Bank-Screenings noch bei den Direkttests mit verschiedenen mitochondrialen Proteinen eine Interaktion mit Cbs1p bzw. Cbs2p gefunden werden konnte. Zunächst könnte der Grund darin liegen, dass es sich bei dem(n) interagierenden Partnerprotein(en) um (ein) stark hydrophobe(s) Protein(e) handeln könnte. Durch die Analysen zur Membranassoziation von Cbs1p in dieser Arbeit verdichten sich die Hinweise, dass es sich um einen integral membranverankerten Interaktionspartner handeln könnte.

Nicht ausgeschlossen werden kann, dass Cbs1p oder/und Cbs2p im Milieu der Kernmatrix nicht in der Lage sind, eine interaktionkompetente Faltung einzunehmen. Eventuell fehlen auch Co-Faktoren, die für eine physikalische Wechselwirkung essentiell sind.

Möglicherweise sind die Schwierigkeiten eines Interaktionsnachweises mitochondrialer Proteine mit dem Two Hybrid-System eher genereller Art. Diese Vermutung resultiert aus der Betrachtung der Daten der genomweiten Two Hybrid-Analyse der Protein-Wechselwirkung aller Hefeproteine (Uetz *et al.*, 2000). Auffallend ist dabei, dass kaum mitochondriale Proteine als Interaktionspartner identifiziert wurden. Allerdings geben die Autoren keine Gründe dafür an. Auch bei Literaturrecherchen sind Two Hybrid-Ergebnisse mit mitochondrialen Proteinen deutlich unterrepräsentiert.

Im Rahmen der Two Hybrid-Analysen (s. 3.4.6.5) konnte eine Homomerisierung von Abc1p gezeigt werden. Neben der starken Aktivierung des Reportergenes *lacZ* (vgl. Abb. 29) führte die Co-Expression von Gal4pBD::Abc1p(48-501) und Gal4pAD::Abc1p(48-501) auch zur Histidin-Prototrophie als Nachweis der Expression des zweiten, unabhängigen Reportergenes *HIS3*.

Bemerkenswerterweise verhindert die Anwesenheit der putativen mitochondrialen Targetsequenz (As 1-47, (Bousquet *et al.*, 1991)) die Detektion dieser Interaktion. Das könnte, wie bereits oben beschrieben, ein Grund sein, weshalb mitochondriale Proteine in genomweiten Two Hybrid-Analysen kaum als Interaktionspartner gefunden werden. Abc1p wird für die Assemblierung von Komplex III benötigt und fungiert möglicherweise als Chaperon (Bousquet *et al.*, 1991; Brasseur *et al.*, 1997).

Die Homomerisierung von Abc1p wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Es ist vorstellbar, dass Abc1p als Homomer die Chaperonfunktion übernimmt, ähnlich der Situation beim Phb1p/Phb2p-Chaperon-Komplex, der für die Stabilisierung mitochondrialer Proteine wichtig ist (Nijtmans *et al.*, 2000). Dieser Komplex besteht aus jeweils 12-16 Monomeren von Phb1p bzw. Phb2p.

Des Weiteren wurden Hinweise für eine Interaktion von Nam1p mit Ymr31p gefunden. Nam1p wird selektiv für die Prozessierung und Stabilität der Transkripte von *COX1*, *COB* und *ATP6* benötigt, wenn diese Introns besitzen (Groudinsky *et al.*, 1993; Wallis *et al.*, 1994). Die *nam1*-Nullmutation besitzt keinen Phänotyp bei Anwesenheit des kurzen, also intronfreien mitochondrialen Genoms. Es wird vermutet, dass Nam1p ein „stem-loop“-RNA-bindendes Protein ist, da die originale Intron-Mutation, die durch Überexpression von *NAM1* supprimiert werden kann, innerhalb von „stem-loop“ reichen Strukturen lag (Groudinsky *et al.*, 1993).

Da es sich bei Ymr31p um ein Protein der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit handelt (Graack and Wittmann-Liebold, 1998; Matsushita *et al.*, 1989), ist vorstellbar, dass die Nam1p-gebundene prä-mRNA über Ymr31p Kontakt zur kleinen mito-ribosomalen Untereinheit aufnimmt. Diese Interaktion wäre dann nur essentiell, solange intronhaltige Transkripte vorliegen.

Allerdings konnte Ymr31p auch in einer Reihe weiterer Two Hybrid-Kombinationen als putativer Interaktionspartner identifiziert werden. Darunter befinden sich das mito-ribosomale Protein MrpS28p der kleinen Untereinheit (Graack and Wittmann-Liebold, 1998) sowie das bereits beschriebene Phb1p. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise auf eine Homomerisierung von Ymr31p. Obwohl Ymr31p weder in Fusion mit Gal4pAD noch mit Gal4pBD separat zu einer Aktivierung der Reportergene führt, weist die Vielzahl der identifizierten Partner möglicherweise auf unspezifische Wechselwirkungen hin, obwohl sich die Interaktionen biologisch problemlos interpretieren ließen. Darüber hinaus fällt auf, dass der Unterschied der Transkriptionsaktivierung des Reportergenes *lacZ* bei Co-Expression der Gal4pBD/AD-Fusionsproteine nur wenig über dem Wert der separat exprimierten Proteinchimären liegt (vgl. Abb. 29).

Eine physikalische Interaktion zwischen Ymr31p und MrpS28p ist vorstellbar, da beide Proteine Komponenten der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit sind.

Da Phb1p (im Komplex mit Phb2p) für die Stabilität neu synthetisierter mitochondrialer Translationsprodukte verantwortlich ist (Nijtmans *et al.*, 2000), ist

auch in diesem Fall eine Interaktion mit Ymr31p vorstellbar, die die Übernahme der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom durch den Chaperon-Komplex in der Membran gewährleisten könnte.

Für Pet123p, ein Protein der kleinen mito-ribosomalen Untereinheit (McMullin *et al.*, 1990), wurde beispielsweise eine genetische Interaktion mit Pet122p, einen Translationsaktivator der COX3-mRNA, gefunden. Diese impliziert eine Verknüpfung der spezifischen Translationsaktivatoren mit der generellen Translationsmaschinerie der Mitochondrien (Haffter *et al.*, 1990). Unter diesem Gesichtspunkt lässt sich auch die Interaktion zwischen Pet123p mit Nam1p deuten. Allerdings konnte diese Interaktion im *in vitro*-Bindungsassay mit GST-gekoppeltem Nam1p nicht verifiziert werden (vgl. nächster Abschnitt).

Alle in dieser Arbeit mit dem Two Hybrid-System identifizierten putativen Interaktionen sind nur als Hinweise zu verstehen. Eine unabhängige Referenzmethode muss eingesetzt werden (z.B. Co-Immunopräzipitation, GST-„pull-down“-Experimente), um die Interaktion zu verifizieren.

Bei den durchgeführten Two Hybrid-Analysen wurde festgestellt, dass der überwiegende Anteil der Gal4pBD-/Gal4pAD-Fusionskombinationen, die in der Lage waren, das *HIS3*-Reportergen zu aktivieren, nicht zu einem Nachweis der Expression der β -Galactosidase führten. Diese Beobachtung deckt sich mit den vergleichenden Untersuchungen zur Expression der Reportergene *lacZ* und *HIS3*. Im Gal4p-abgeleiteten Two Hybrid-System ist das *lacZ*-Reportergen stringenter, d.h. ergibt weniger „falsch“ Positive als das *HIS3*-Gen (van Criekinge and Beyaert, 1999).

Im Stamm HF7c, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte das belegt werden durch die Austitrierung einer Protein-Protein-Interaktion (Ras-Raf) in Abhängigkeit von der Konzentration eines 3. Partners („reverse three hybrid“) (Tirode *et al.*, 1997). Die Autoren konnten zeigen, dass die regulierbare Expression von Raf von einem unabhängigen Promotor die Interaktion zwischen Gal4pBD::Ras und Gal4pAD::Raf austitrieren konnte. Das führte zum erwarteten *lacZ*-negativen Phänotyp, nicht jedoch zum *HIS3*-negativen Phänotyp. Dieser Befund impliziert, dass das *HIS3*-Reportergen im Stamm HF7c sensitiver ist (Tirode *et al.*, 1997).

Anders verhält es sich möglicherweise im diploiden Two Hybrid-Stamm, der durch Kreuzung aus den Stämmen HF7c und Y187 hervorging und für die Two Hybrid-Screeningexperimente verwendet wurde. In diesem Stamm stehen beide Reportergene jeweils unter der Kontrolle des *GAL1* Promotors. Somit sind die Reportergene in dieser Hinsicht vergleichbar sensitiv.

Trotzdem konnte auch bei diesem diploiden Stamm in den *HIS3*-positiven Klonen nicht immer die Expression der β -Galactosidase nachgewiesen werden.

Möglicherweise liegt diese Beobachtung im „leaky“ *HIS3* Promotor begründet. Die integrierte Two Hybrid-*HIS3*-Kassette im Stamm HF7c enthält neben dem *GAL1* Promotor auch noch Teile des *HIS3* Promotors, die eine schwache konstitutive Expression von *HIS3* ermöglichen (ClonTech, Matchmaker Two Hybrid-System 2-Protokoll). Diese Basalexpression kann durch Zugabe von 3-AT, einem Histidin-Analogon, gehemmt werden. Allerdings war ein Zusatz von 3-AT bei der Selektion des aus der Kreuzung von Y187 und HF7c hervorgehenden diploiden Stammes nicht notwendig, da die als Negativkontrollen mitgeführten Klone kein Wachstum auf den Selektivplatten ohne Histidin aufwiesen. Denkbar ist jedoch, dass einige Two Hybrid-Konstrukte in Kombination mit der Besonderheit des *HIS3* Promotors eine Expression des Reportergenes hervorrufen können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Two Hybrid-System nur bedingt für ein Screening mitochondrialer Proteine geeignet ist. Außer der Tatsache, dass die Kernmatrix - der Ort der Two Hybrid-vermittelten Transkriptionsaktivierung - *in sensu strictu* nicht den *in vivo*-Bedingungen im Mitochondrion entspricht, führen offenbar auch die mitochondrialen Importsignale sowie der hydrophobe Charakter der Partnerproteine zu Schwierigkeiten.

4.5 *In vitro*-Interaktionsanalyse

Nam1p wurde als putativ interagierender Partner im Two Hybrid-Screening identifiziert und aus diesem Grunde für GST-„pull-down“-Experimente zur Verifizierung der Two Hybrid-Ergebnisse eingesetzt. Die im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Interaktionen von Nam1p mit Ymr31p bzw. Pet123p konnten nicht bestätigt werden. Offensichtlich treffen die Einschränkungen zu, die zur Wertung dieser Interaktionsbefunde bereits diskutiert wurden (s. oben).

Überraschenderweise konnte mit der Nam1p-gekoppelten Sepharose sowohl das Gal4pBD-Fusionsprotein mit Cbs1p(30-233) als auch mit Cbs2p(1-389) präzipitiert werden.

Bei Cbs2p sind möglicherweise die C-terminalen 87 As an der physikalischen Wechselwirkung mit Nam1p beteiligt. Es bleibt offen, ob diese Interaktion direkt oder indirekt stattfindet.

Für eine spezifische Interaktion sprechen die Befunde, dass weder Gal4pBD noch die Fusionsproteine mit Ymr31p bzw. Pet123p durch GST::Nam1p gekoppelte Sepharose präzipitiert werden konnten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der GST-Anteil der Fusion nicht für die Interaktion verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte ein Teilbereich (As 233-302) von Cbs2p identifiziert werden, der nicht mehr in der Lage ist, die Bindung zu Nam1p zu vermitteln.

Allerdings konnten die Interaktionen von Cbs1p bzw. Cbs2p mit Nam1p in Anwesenheit von 1 mM DTT in den Lyse- und Bindungs-Puffern nicht reproduziert werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beobachteten Interaktionen möglicherweise auf unspezifischen Disulfid-Brücken, die sich im oxidierenden Milieu bilden können, basieren.

Weiterhin ist vorstellbar, dass DTT die Interaktion direkt behindert. Dies kann in weiteren Experimenten durch den Einsatz anderer reduzierender Agenzien (β -Mercaptoethanol) ausgeschlossen werden.

In der Literatur finden sich sowohl Beschreibungen von *in vitro*-Bindungsstudien mit (Fletcher *et al.*, 1999; Koizumi *et al.*, 1999; Larin *et al.*, 1999; Zabel *et al.*, 1999) als auch ohne (Casareno *et al.*, 1998; Paumen *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1998; Sakuragi *et al.*, 1999) Einsatz von DTT.

Die Befunde sprechen eher für eine schwache Interaktion der Partner, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bindungen unspezifisch vermittelt werden. Es ist daher unerlässlich, diese Interaktion durch Co-Immunopräzipitation zu verifizieren.

Falls die gefundenen putativen Interaktionen mit Nam1p tatsächlich die Situation *in vivo* repräsentieren, lässt sich Folgendes spekulieren:

Nam1p ist essentiell für die Stabilisierung und Prozessierung ausschließlich intronhaltiger mRNAs von *COB*, *COX1* und *ATP6*. Eine Interaktion von Nam1p mit den Translationsaktivatoren Cbs1p bzw. Cbs2p könnte bedeuten, dass die intronhaltige *COB* prä-mRNA über Cbs2p an die Ribosomen dirigiert wird.

Denkbar ist auch, dass die Ribosomen erst durch diese Interaktion lizenziert werden, die intronhaltige prä-mRNA zu translatieren.

Die Interaktion mit Cbs1p könnte zudem verhindern, dass unreife Vorläuferproteine (Maturasen), die bereits über transmembrane Bereiche verfügen, in die Membran inseriert werden. Sobald intronfreie mRNA gebildet wurde, bedarf es nicht mehr der Aktivität von Nam1p und somit ist auch die Interaktion mit Cbs1p/Cbs2p unter diesen Bedingungen nicht mehr essentiell.

Eine Konsequenz aus diesen Überlegungen ist, dass Nam1p auch mit spezifischen Translationsaktivatoren der *COX*- bzw. *ATP6*-mRNA wechselwirken müsste.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Cbs1p, einem spezifischen Translationsaktivator der *COB*-mRNA. Im Mittelpunkt standen die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von Cbs1p sowie ein Screening nach Interaktionskandidaten von Cbs1p und/oder Cbs2p.

Die biochemischen Analysen zeigen, dass Cbs1p als peripheres Membranprotein fest mit der inneren Mitochondrienmembran matrixseitig assoziiert vorliegt. Dabei spielen möglicherweise hydrophobe und/oder Protein-Protein-Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen eine essentielle Rolle. Die vorliegenden Daten sprechen für eine Beteiligung des C-terminalen Segmentes von Cbs1p an der Membranverankerung.

Untersuchungen zur Membranassoziation von Cbs1p in Mitochondrien aus *rho*⁰-Zellen lassen vermuten, dass es sich bei diesem(n) Partnerprotein(en) um (eine) Komponente(n) handeln könnte, die direkt - als Untereinheit - oder indirekt an der Assemblierung des *bc₁*-Komplexes beteiligt sind (ist).

Durch die Identifizierung von atmungsdefekten *cbs1*-Mutanten, deren Mutationen in Bereichen mit Homologie zu RNA-bindenden Proteinen oder der RNP1/2-Konsensus-Sequenz RNA-bindender Proteine liegt, verstärken sich die Hinweise zur Beteiligung von Cbs1p an der direkten physikalischen Wechselwirkung mit dem 5'-leader der *COB*-mRNA.

Die Mutagenese des N-terminalen Segmentes von Cbs1p lieferte neue Erkenntnisse zum Import von Cbs1p in die Mitochondrien. Es konnte gezeigt werden, dass die abspaltbare Präsequenz von Cbs1p (As 1-29) nicht essentiell für ein mitochondriales Targeting ist. Damit muss für Cbs1p eine weitere (interne) Targeting-Information postuliert werden, die möglicherweise im N-terminalen Drittel des maturen Proteins liegt.

Die erzielten Ergebnisse präzisieren und erweitern das vorliegende Modell (Michaelis, 1991) der Wirkungsweise der Translationsaktivatoren Cbs1p und Cbs2p (Abb. 36).

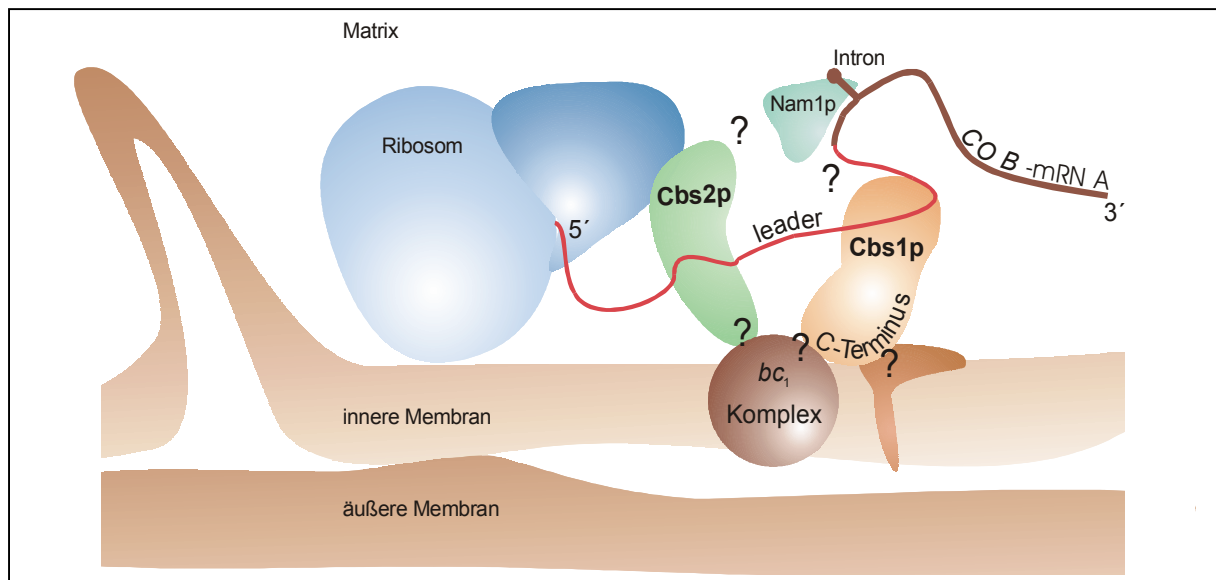


Abb. 36: **Modell der Funktionsweise von Cbs1p und Cbs2p**

Aufgrund der Membranverankerung von Cbs1p wird auch die gebundene COB-mRNA in räumlicher Nähe zur Membran gebracht. Darüber hinaus definiert Cbs1p damit möglicherweise auch den Ort der Insertion des naszierenden Apocytochroms *b* in die Membran. Cbs2p vermittelt die Bindung zur kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen und könnte seinerseits ebenfalls in Interaktionen mit Untereinheiten des *bc₁*-Komplexes involviert sein. Somit verzahnen sich die einzelnen molekularen Vorgänge der Transkriptreifung, Translation und Insertion im Kontext mit der Membran. Das impliziert, dass sich weitere Komponenten, beispielsweise der Transkriptreifung, in unmittelbarer Nachbarschaft - möglicherweise auch direkt interagierend - zu Cbs1p bzw. Cbs2p befinden.

Einen derartigen Faktor könnte Nam1p darstellen, das u.a. für die Stabilität und die Prozessierung intronhaltiger COB-mRNA verantwortlich ist. Eine potentielle Interaktion mit Cbs1p und Cbs2p konnte durch *in vitro*-Bindungsstudien unter Verwendung eines GST-Nam1p-Fusionsproteins gezeigt werden.

Zur Identifizierung interagierender Proteine mit dem Two Hybrid-System wurden neben Cbs1p und Cbs2p eine Reihe weiterer Proteine aus dem funktionellen Umfeld mit Gal4pBD bzw. Gal4pAD fusioniert und im Direkttest auf mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht. Für die verwendeten Gal4pBD/AD-Fusionen wurden deren Expression und für Gal4pBD::Cbs1p die Kernlokalisierung als essentielle Voraussetzung des Two Hybrid-Systems verifiziert.

Im Rahmen dieser Analysen - gleichzeitig Beleg für die prinzipielle Tauglichkeit des eingesetzten Systems - konnte die Homomerisierung von Abc1p, einem Assemblierungsfaktors des *bc₁*-Komplexes, gezeigt werden.

Bezüglich Cbs1p und Cbs2p konnten weder beim Screening von cDNA-Banken aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* noch im Direkttest interagierende Proteine identifiziert werden. Dieser Befund unterstreicht die Beobachtung, dass das Two Hybrid-System nur bedingt für die Untersuchung von physikalischen Interaktionen mitochondrialer Proteine geeignet ist.

6 Referenzen

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, **100**, 551-60.
- Algeri, A.A., Bianchi, L., Viola, A.M., Puglisi, P.P. and Marmioli, N. (1981) *IMP1/imp1*: a gene involved in the nucleo-mitochondrial control of galactose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **97**, 27-44.
- Allen, J.L. and Douglas, M.G. (1989) Organization of the nuclear pore complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, **102**, 95-108.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-10.
- Baker, A. and Schatz, G. (1987) Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3117-21.
- Bandlow, W., Wied, S. and Müller, G. (1995) Glucose induces amphiphilic to hydrophilic conversion of a subset of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoproteins in yeast. *Arch Biochem Biophys*, **324**, 300-16.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev*, **3**, 431-7.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Boumans, H., Berden, J.A. and Grivell, L.A. (1996) Topological organization of subunits VII and VIII in the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **390**, 137-41.
- Boumans, H., Grivell, L.A. and Berden, J.A. (1998) The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J Biol Chem*, **273**, 4872-7.
- Bousquet, I., Dujardin, G. and Slonimski, P.P. (1991) *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome *b* mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the *bc₁* complex. *Embo J*, **10**, 2023-31.
- Brasseur, G., Tron, G., Dujardin, G., Slonimski, P.P. and Brivet-Chevillotte, P. (1997) The nuclear *ABC1* gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome *bc₁* complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *Eur J Biochem*, **246**, 103-11.
- Brown, N.G., Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1994) Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 1045-53.
- Buchwald, P., Krummeck, G. and Rödel, G. (1991) Immunological identification of yeast SCO1 protein as a component of the inner mitochondrial membrane. *Mol Gen Genet*, **229**, 413-20.
- Bui, D.M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. and Schweyen, R.J. (1999) The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **274**, 20438-43.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-21.

- Cariello, N.F., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1991) Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4193-8.
- Casareno, R.L., Waggoner, D. and Gitlin, J.D. (1998) The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **273**, 23625-8.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K. and Botstein, D. (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **387**, 67-73.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast [published erratum appears in Science 1998 Nov 20;282(5393):1421]. *Science*, **282**, 699-705.
- Costanzo, M.C., Bonnefoy, N., Williams, E.H., Clark-Walker, G.D. and Fox, T.D. (2000a) Highly diverged homologs of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial mRNA-specific translational activators have orthologous functions in other budding yeasts. *Genetics*, **154**, 999-1012.
- Costanzo, M.C., Hogan, J.D., Cusick, M.E., Davis, B.P., Fancher, A.M., Hodges, P.E., Kondu, P., Lengieza, C., Lew-Smith, J.E., Lingner, C., Roberg-Perez, K.J., Tillberg, M., Brooks, J.E. and Garrels, J.I. (2000b) The yeast proteome database (YPD) and *Caenorhabditis elegans* proteome database (WormPD): comprehensive resources for the organization and comparison of model organism protein information. *Nucleic Acids Res*, **28**, 73-6.
- Costanzo, M.C. and Fox, T.D. (1988) Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2677-81.
- Creusot, F., Verdiere, J., Gaisne, M. and Slonimski, P.P. (1988) CYP1 (HAP1) regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. I. Overall organization of the protein sequence displays several novel structural domains. *J Mol Biol*, **204**, 263-76.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2000) The cytochrome *bc₁* and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **275**, 18093-18098.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, **10**, 673-6.
- Daum, G., Bohni, P.C. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome *b₂* and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, **257**, 13028-33.
- Davis, A.J., Ryan, K.R. and Jensen, R.E. (1998) Tim23p contains separate and distinct signals for targeting to mitochondria and insertion into the inner membrane. *Mol Biol Cell*, **9**, 2577-93.
- De La Salle, H., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1982) Critical sequences within mitochondrial introns: pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the *box* intron controlling reductase and oxidase. *Cell*, **28**, 721-32.
- De Vit, M.J., Waddle, J.A. and Johnston, M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*, **8**, 1603-18.
- Deber, C.M. and Goto, N.K. (1997) Conformational properties of amino acids in transmembrane helices. In von Heijne, G. (ed.) *Membrane Protein Assembly*. R. G. Landes Company, New York, pp. 25-37.

- DeLabre, M.L., Nett, J.H. and Trumpower, B.L. (1999) The cleaved presequence is not required for import of subunit 6 of the cytochrome *bc₁* complex into yeast mitochondria or assembly into the complex. *FEBS Lett*, **449**, 201-5.
- Deleage, G. and Roux, B. (1987) An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng*, **1**, 289-94.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-6.
- Dieckmann, C.L. and Tzagoloff, A. (1985) Assembly of the mitochondrial membrane system. *CBP6*, a yeast nuclear gene necessary for synthesis of cytochrome *b*. *J Biol Chem*, **260**, 1513-20.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B. and Lill, R. (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11752-7.
- Dircks, L.K. and Poyton, R.O. (1990) Overexpression of a leaderless form of yeast cytochrome *c* oxidase subunit Va circumvents the requirement for a leader peptide in mitochondrial import. *Mol Cell Biol*, **10**, 4984-6.
- Donnini, C., Lodi, T., Ferrero, I., Algeri, A. and Puglisi, P.P. (1992) Allelism of *IMP1* and *GAL2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **174**, 3411-5.
- Douglas, H.C. and Hawthorne, D.C. (1964) Enzymatic expression and genetic linkage of genes controlling galactose utilization in *Saccharomyces*. *Genetics*, **49**, 837-844.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-6.
- Finnegan, P.M., Ellis, T.P., Nagley, P. and Lukins, H.B. (1995) The mature *AEP2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, required for the expression of subunit 9 of ATP synthase, is a 58 kDa mitochondrial protein. *FEBS Lett*, **368**, 505-8.
- Fischer, K. (2000) Helical Wheel Custom Images and Interactive Java Applet. , Berkeley., <http://marqusee9.berkeley.edu/kael/helical.htm>
- Fletcher, C.M., Pestova, T.V., Hellen, C.U. and Wagner, G. (1999) Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *Embo J*, **18**, 2631-7.
- Folsch, H., Gaume, B., Brunner, M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1998) C- to N-terminal translocation of preproteins into mitochondria. *Embo J*, **17**, 6508-15.
- Forsbach, V. (1989) *CBS1*, ein Hefe-Kerngen: Genomische Organisation und Expression. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, p. 76.
- Forsbach, V., Pillar, T., Gottenof, T. and Rödel, G. (1989) Chromosomal localization and expression of *CBS1*, a translational activator of cytochrome *b* in yeast. *Mol Gen Genet*, **218**, 57-63.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **440**, 325-31.
- Fox, T.D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia*, **52**, 1130-5.
- Frishman, D. and Argos, P. (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng*, **9**, 133-42.

- Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two- hybrid screens. *Nat Genet*, **16**, 277-82.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. and Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*, **120**, 97-120.
- Gavel, Y., Nilsson, L. and von Heijne, G. (1988) Mitochondrial targeting sequences. Why 'non-amphiphilic' peptides may still be amphiphilic. *FEBS Lett*, **235**, 173-7.
- Geourjon, C. and Deleage, G. (1994) SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng*, **7**, 157-64.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. and Robson, B. (1987) Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J Mol Biol*, **198**, 425-43.
- Glerum, D.M. and Tzagoloff, A. (1997) Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett*, **412**, 410-4.
- Gonzalez-Halphen, D., Vazquez-Acevedo, M. and Garcia-Ponce, B. (1991) On the interaction of mitochondrial complex III with the Rieske iron-sulfur protein (subunit V). *J Biol Chem*, **266**, 3870-6.
- Graack, H.R. and Wittmann-Liebold, B. (1998) Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem J*, **329**, 433-48.
- Gray, M.W. (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 884-90.
- Grivell, L.A., Artal-Sanz, M., Hakkaart, G., de Jong, L., Nijtmans, L.G., van Oosterum, K., Siep, M. and van der Spek, H. (1999) Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett*, **452**, 57-60.
- Grohmann, L., Kitakawa, M., Isono, K., Goldschmidt-Reisin, S. and Graack, H.R. (1994) The yeast nuclear gene *MRP-L13* codes for a protein of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Curr Genet*, **26**, 8-14.
- Groudinsky, O., Bousquet, I., Wallis, M.G., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1993) The *NAM1/MTF2* nuclear gene product is selectively required for the stability and/or processing of mitochondrial transcripts of the *atp6* and of the mosaic, *cox1* and *cytb* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **240**, 419-27.
- Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. and Deleage, G. (1999) Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics*, **15**, 413-21.
- Haffter, P. and Fox, T.D. (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator *PET122* by mutations in two new genes, *MRP17* and *PET127*. *Mol Gen Genet*, **235**, 64-73.
- Haffter, P., McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1990) A genetic link between an mRNA-specific translational activator and the translation system in yeast mitochondria. *Genetics*, **125**, 495-503.

- Haffter, P., McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1991) Functional interactions among two yeast mitochondrial ribosomal proteins and an mRNA-specific translational activator. *Genetics*, **127**, 319-26.
- Haggie, P.M. and Brindle, K.M. (1999) Mitochondrial citrate synthase is immobilized in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 3941-5.
- Hamel, P., Lemaire, C., Bonnefoy, N., Brivet-Chevillotte, P. and Dujardin, G. (1998) Mutations in the membrane anchor of yeast cytochrome *c*₁ compensate for the absence of Oxa1p and generate carbonate-extractable forms of cytochrome *c*₁. *Genetics*, **150**, 601-11.
- Hase, T., Harabayashi, M., Kawai, K. and Matsubara, H. (1987) A carboxyl-terminal hydrophobic region of yeast cytochrome *c*₁ is necessary for functional assembly into complex III of the respiratory chain. *J Biochem (Tokyo)*, **102**, 411-9.
- Hengen, P.N. (1997) False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem Sci*, **22**, 33-4.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, **2**, 163-7.
- Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-28.
- Inoue, M., Muto, Y., Sakamoto, H., Kigawa, T., Takio, K., Shimura, Y. and Yokoyama, S. (1997) A characteristic arrangement of aromatic amino acid residues in the solution structure of the amino-terminal RNA-binding domain of *Drosophila* sex-lethal. *J Mol Biol*, **272**, 82-94.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699-704.
- Keohavong, P. and Thilly, W.G. (1989) Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9253-7.
- King, R.D. and Sternberg, M.J. (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci*, **5**, 2298-310.
- Kitakawa, M., Graack, H.R., Grohmann, L., Goldschmidt-Reisin, S., Herfurth, E., Wittmann-Liebold, B., Nishimura, T. and Isono, K. (1997) Identification and characterization of the genes for mitochondrial ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **245**, 449-56.
- Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Hagiwara, M. (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem*, **274**, 11125-31.
- Körte, A. (1989) Mitochondriale Genexpression bei *Saccharomyces cerevisiae*: Abhängigkeit der Translation der mitochondrialen Cytochrom *b* RNA von den beiden nucleären Genen *CBS1* und *CBS2*. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, p. 163.
- Körte, A., Forsbach, V., Gottenöf, T. and Rödel, G. (1989) *In vitro* and *in vivo* studies on the mitochondrial import of *CBS1*, a translational activator of cytochrome *b* in yeast. *Mol Gen Genet*, **217**, 162-167.

- Krause-Buchholz, U., Tzschope, K., Paret, C., Ostermann, K. and Rödel, G. (2000) Identification of functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translational activator Cbs1p. *Yeast*, **16**, 353-363.
- Krummeck, G. (1992) Das mitochondriale SCO1 Protein von *Saccharomyces cerevisiae*: Untersuchungen zu Expression, Topologie und Funktion. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, p. 168.
- Kruttgen, A., Heymach, J.V., Jr., Kahle, P.J. and Shooter, E.M. (1997) The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability. *J Biol Chem*, **272**, 29222-8.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-32.
- Labouesse, M., Netter, P. and Schroeder, R. (1984) Molecular basis of the 'box effect', A maturase deficiency leading to the absence of splicing of two introns located in two split genes of yeast mitochondrial DNA. *Eur J Biochem*, **144**, 85-93.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Larin, D., Mekios, C., Das, K., Ross, B., Yang, A.S. and Gilliam, T.C. (1999) Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J Biol Chem*, **274**, 28497-504.
- Lemmon, M.A., MacKenzie, K.R., Arkin, I.T. and Engelmann, D.M. (1997) Transmembrane α -helix interactions in folding and oligomerization of integral membrane proteins. In von Heijne, G. (ed.) *Membrane Protein Assembly*. R. G. Landes Company, New York, pp. 4-23.
- Leuenberger, D., Bally, N.A., Schatz, G. and Koehler, C.M. (1999) Different import pathways through the mitochondrial intermembrane space for inner membrane proteins. *Embo J*, **18**, 4816-22.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A. and Butow, R.A. (1991) Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (*CIT2*) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 38-46.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C. and Kispal, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron- sulfur proteins. *Biol Chem*, **380**, 1157-66.
- Lim, P.S., Jenson, A.B., Cowser, L., Nakai, Y., Lim, L.Y., Jin, X.W. and Sundberg, J.P. (1990) Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *J Infect Dis*, **162**, 1263-9.
- Lindegren, G., Hwang, Y.L., Oshima, Y. and Lindegren, C.C. (1965) Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in *Saccharomyces*. *Can J Genet Cytol*, **7**, 491-9.
- Liu, Z. and Butow, R.A. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol*, **19**, 6720-8.
- Louvet, O., Doignon, F. and Crouzet, M. (1997) Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques*, **23**, 816-8, 820.
- Manthey, G.M. and McEwen, J.E. (1995) The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-

- containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 4031-43.
- Manthey, G.M., Przybyla-Zawislak, B.D. and McEwen, J.E. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur J Biochem*, **255**, 156-61.
- Masters, B.S., Stohl, L.L. and Clayton, D.A. (1987) Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*, **51**, 89-99.
- Matsushita, Y., Kitakawa, M. and Isono, K. (1989) Cloning and analysis of the nuclear genes for two mitochondrial ribosomal proteins in yeast. *Mol Gen Genet*, **219**, 119-24.
- McMullin, T.W. and Fox, T.D. (1993) COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **268**, 11737-41.
- McMullin, T.W., Haffter, P. and Fox, T.D. (1990) A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. *Mol Cell Biol*, **10**, 4590-5.
- Mewes, H.W., Heumann, K., Kaps, A., Mayer, K., Pfeiffer, F., Stocker, S. and Frishman, D. (1999) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res*, **27**, 44-8.
- Michaelis, U. (1991) Expression des mitochondrialen Cytochrom *b*-Genes bei *Saccharomyces cerevisiae*: Molekulare und biochemische Charakterisierung der Translationsaktivatoren *CBS1* und *CBS2*. *Fakultät für Biologie*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, p. 179.
- Michaelis, U., Körte, A. and Rödel, G. (1991) Association of cytochrome *b* translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome *b* expression in yeast. *Mol Gen Genet*, **230**, 177-85.
- Michaelis, U. and Rödel, G. (1990) Identification of *CBS2* as a mitochondrial protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **223**, 394-400.
- Miller, B.R. and Cumsky, M.G. (1993) Intramitochondrial sorting of the precursor to yeast cytochrome *c* oxidase subunit Va. *J Cell Biol*, **121**, 1021-9.
- Mittelmeier, T.M. and Dieckmann, C.L. (1995) *In vivo* analysis of sequences required for translation of cytochrome *b* transcripts in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol*, **15**, 780-9.
- Müller, G. and Bandlow, W. (1989a) An amphitropic cAMP-binding protein in yeast mitochondria. 1. Synergistic control of the intramitochondrial location by calcium and phospholipid. *Biochemistry*, **28**, 9957-67.
- Müller, G. and Bandlow, W. (1989b) An amphitropic cAMP-binding protein in yeast mitochondria. 2. Phospholipid nature of the membrane anchor. *Biochemistry*, **28**, 9968-73.
- Müller, G. and Bandlow, W. (1989c) An amphitropic cAMP-binding protein in yeast mitochondria. 3. Membrane release requires both Ca^{2+} -dependent phosphorylation of the cAMP-binding protein and a phospholipid-activated mitochondrial phospholipase. *Biochemistry*, **28**, 9974-81.
- Müller, M. and Martin, W. (1999) The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Bioessays*, **21**, 377-81.
- Müller, P.P. and Fox, T.D. (1984) Molecular cloning and genetic mapping of the *PET494* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **195**, 275-80.

- Mumberg, D., Müller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-22.
- Myer, V.E. and Young, R.A. (1998) RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem*, **273**, 27757-60.
- Nijtmans, L.G., de Jong, L., Artal Sanz, M., Coates, P.J., Berden, J.A., Back, J.W., Muijsers, A.O., van Der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *Embo J*, **19**, 2444-2451.
- Oyedotun, K.S. and Lemire, B.D. (1997) The carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase membrane subunit, SDH4p, is necessary for ubiquinone reduction and enzyme stability. *J Biol Chem*, **272**, 31382-8.
- Partaledis, J.A. and Mason, T.L. (1988) Structure and regulation of a nuclear gene in *Saccharomyces cerevisiae* that specifies MRP13, a protein of the small subunit of the mitochondrial ribosome. *Mol Cell Biol*, **8**, 3647-60.
- Paumen, M.B., Ishida, Y., Han, H., Muramatsu, M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Honjo, T. (1997) Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 523-5.
- Payne, M.J., Finnegan, P.M., Smooker, P.M. and Lukins, H.B. (1993) Characterization of a second nuclear gene, *AEP1*, required for expression of the mitochondrial *OLI1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **24**, 126-35.
- Penefsky, H.S. and Tzagoloff, A. (1971) Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes. *Methods Enzymol*, **22**, 204-219.
- Pillar, T., Lang, B.F., Steinberger, I., Vogt, B. and Kaudewitz, F. (1983) Expression of the "split gene" *cob* in yeast mtDNA. Nuclear mutations specifically block the excision of different introns from its primary transcript. *J Biol Chem*, **258**, 7954-9.
- Pogulis, R.J., Vallejo, A.N. and Pease, L.R. (1996) *In vitro* recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol Biol*, **57**, 167-76.
- Poutre, C.G. and Fox, T.D. (1987) *PET111*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics*, **115**, 637-47.
- Query, C.C., Bentley, R.C. and Keene, J.D. (1989) A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell*, **57**, 89-101.
- Reddy, K.B., Gascard, P., Price, M.G., Negrescu, E.V. and Fox, J.E.B. (1998) Identification of an interaction between the m-band protein skelemin and beta-integrin subunits. Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J Biol Chem*, **273**, 35039-47.
- Rep, M. and Grivell, L.A. (1996a) *MBA1* encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett*, **388**, 185-8.
- Rep, M. and Grivell, L.A. (1996b) The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. *Curr Genet*, **30**, 367-80.
- Rieger, K.J., Aljinovic, G., Lazowska, J., Pohl, T.M. and Slonimski, P.P. (1997) A novel nuclear gene, *CBT1*, essential for mitochondrial cytochrome *b* formation: terminal processing of mRNA and intron dependence. *Curr Genet*, **32**, 163-74.

- Rödel, G. (1986) Two yeast nuclear genes, *CBS1* and *CBS2*, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated *COB* leader. *Curr Genet*, **11**, 41-5.
- Rödel, G., Michaelis, U., Forsbach, V., Kreike, J. and Kaudewitz, F. (1986) Molecular cloning of the yeast nuclear genes *CBS1* and *CBS2*. *Curr Genet*, **11**, 47-53.
- Rosenberg, I.M. (1996) Membrane and particulate-associated proteins. In Rosenberg, I.M. (ed.) *Protein Analysis and Purification*. Birkhäuser, Boston, pp. 135-152.
- Rosenkrantz, M., Kell, C.S., Pennell, E.A. and Devenish, L.J. (1994) The HAP2,3,4 transcriptional activator is required for derepression of the yeast citrate synthase gene, *CIT1*. *Mol Microbiol*, **13**, 119-31.
- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P. and Sander, C. (1995) Transmembrane helices predicted at 95 % accuracy. *Protein Sci*, **4**, 521-33.
- Rost, B. and Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J Mol Biol*, **232**, 584-99.
- Sakuragi, S., Liu, Q. and Craig, E. (1999) Interaction between the nucleotide exchange factor Mge1 and the mitochondrial Hsp70 Ssc1. *J Biol Chem*, **274**, 11275-82.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Schägger, H., Link, A.T., Engel, W.D. and von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the *bc₁* complex from beef heart. *Methods in Enzymology*, Vol. 126.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-31.
- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-46.
- Schilke, B., Forster, J., Davis, J., James, P., Walter, W., Laloraya, S., Johnson, J., Miao, B. and Craig, E. (1996) The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J Cell Biol*, **134**, 603-13.
- Sekito, T., Thornton, J. and Butow, R.A. (2000) Mitochondria-to-Nuclear Signaling Is Regulated by the Subcellular Localization of the Transcription Factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell*, **11**, 2103-2115.
- Serrano, R., Marquez, J.A. and Rios, G. (1997) Crucial factors in salt stress tolerance. In Hohmann, S. and Mager, W.H. (eds.), *Yeast Stress Responses*. R.G. Landes Company, New York, pp. 147-169.
- Shafikhani, S., Siegel, R.A., Ferrari, E. and Schellenberger, V. (1997) Generation of large libraries of random mutants in *Bacillus subtilis* by PCR-based plasmid multimerization. *Biotechniques*, **23**, 304-10.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [see comments]. *Nature*, **399**, 483-7.
- Siep, M., van Oosterum, K., Neufeglise, H., van der Spek, H. and Grivell, L.A. (2000) Mss51p, a putative translational activator of cytochrome c oxidase subunit-1 (COX1) mRNA, is required for synthesis of Cox1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **37**, 213-20.

- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Soubannier, V., Rusconi, F., Vaillier, J., Arselin, G., Chaignepain, S., Graves, P.V., Schmitter, J.M., Zhang, J.L., Mueller, D. and Velours, J. (1999) The second stalk of the yeast ATP synthase complex: identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit 4 (subunit b). *Biochemistry*, **38**, 15017-24.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-17.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-97.
- Spiegelman, S. (1945) The effect of anaerobiosis on adaptation to enzyme formation. *J Cell Comp Physiol*, **26**, 121-131.
- Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol*, **19**, 3435-42.
- Struhl, K. (1995) Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu Rev Genet*, **29**, 651-74.
- Szczepaniak, A., Frank, K. and Rybka, J. (1995) Membrane association of the Rieske iron-sulfur protein. *Z Naturforsch [C]*, **50**, 535-42.
- Tirode, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J. and Egly, J.M. (1997) A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J Biol Chem*, **272**, 22995-9.
- Tzagoloff, A., Crivellone, M.D., Gampel, A., Muroff, I., Nishikimi, M. and Wu, M. (1988) Mutational analysis of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **319**, 107-20.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-7.
- van Criekege, W. and Beyaert, R. (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online*, **2**, 1-38.
- Verner, K. and Beers, J. (1995) Biological membranes. In Verner, K. and Beers, J. (eds.), *Intracellular Protein Transport And Membrane Biogenesis*. R. G. Landes Company, New York, pp. 15-26.
- von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J*, **5**, 1335-42.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous *HIS3* marker and *GFP* reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 1065-75.
- Wallis, M.G., Groudinsky, O., Slonimski, P.P. and Dujardin, G. (1994) The NAM1 protein (NAM1p), which is selectively required for *cox1*, *cytb* and *atp6* transcript processing/stabilisation, is located in the yeast mitochondrial matrix. *Eur J Biochem*, **222**, 27-32.

- Weber, E.R. and Dieckmann, C.L. (1990) Identification of the CBP1 polypeptide in mitochondrial extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **265**, 1594-600.
- Weiss, C., Oppliger, W., Vergeres, G., Demel, R., Jenö, P., Horst, M., de Kruijff, B., Schatz, G. and Azem, A. (1999) Domain structure and lipid interaction of recombinant yeast Tim44. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8890-4.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. and Lockhart, D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, **15**, 1359-67.
- Wolf, J.R., Lasher, R.S. and Franzusoff, A. (1996) The putative membrane anchor protein for yeast Sec7p recruitment. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 126-33.
- Wolf, K., Dujon, B. and Slonimski, P.P. (1973) Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, **125**, 53-90.
- Zabel, U., Hausler, C., Weeger, M. and Schmidt, H.H. (1999) Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione S-transferase affinity tag. *J Biol Chem*, **274**, 18149-52.
- Zara, V., Palmieri, F., Mahlke, K. and Pfanner, N. (1992) The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import. *J Biol Chem*, **267**, 12077-81.
- Zollner, A., Rödel, G. and Haid, A. (1992) Molecular cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* CYT2 gene encoding cytochrome-c₁-heme lyase. *Eur J Biochem*, **207**, 1093-100.

Danksagung

„Der heutige Tag ist ein Resultat des gestrigen.“ In diesem Sinne der Worte von Heinrich Heine möchte ich Dank sagen allen, die mir mit Ratschlägen, Einzelhinweisen und in offener kritischer Auseinandersetzung halfen, diesen „heutigen Tag“ zu erreichen.

„Was dieser gewollt hat, müssen wir erforschen, wenn wir zu wissen wünschen, was jener will.“, d.h. im Konkreten war das meine spezielle Arbeitsaufgabe, mein Thema, das mir von Herrn Prof. Dr. Gerhard Rödel bereitgestellt wurde. Ihm gilt dafür mein besonderer Dank. Seiner Aufgeschlossenheit, seinem kontinuierlichem Interesse am Fortgang der Arbeit, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft verdanke ich wertvolle Hinweise und Anregungen. Die mir gewährten Forschungsfreiheiten sowie die Möglichkeit eines ½ jährigen Forschungsaufenthaltes im Hans-Knöll-Institut in Jena waren mir eine wertvolle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Hans Peter Saluz, Herrn Dr. Thomas Munder, Frau Dr. Yvonne Berghöfer-Hochheimer und Herrn Dr. Gert Mayer danke ich für die freundliche Aufnahme und wissenschaftliche Betreuung während meiner Arbeit am Hans-Knöll-Institut.

Für die ständige Bereitschaft zur Diskussion wissenschaftlicher Fragestellungen gilt Herrn Prof. Dr. Michael Göttfert mein Dank.

Dem Institut für Allgemeine Mikrobiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerold Barth sowie dem Institut für Allgemeine Zoologie unter Leitung von Prof. Dr. Herwig O. Gutzeit danke ich für die unkomplizierte Nutzung der technischen Ausstattungen.

Für die Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und die ständige Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei Herrn Dr. Kai Ostermann, Frau Claudia Paret, Frau Kathrin Tzschoppe und Frau Anja Rentzsch.

Frau Katja Gunkel gilt mein herzlicher Dank für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung beim Schreiben und der Drucklegung der Arbeit.

Ein „Dankeschön“ auch den Ungenannten „hinter den Kulissen“, die mir die praktischen Arbeiten oder die „Büro-Arbeiten“ erleichterten. Besonders genannt seien an dieser Stelle Frau Renate Werker, Frau Melanie Pielenz, Frau Ursula Degenhardt und Frau Marlis Thiel.

Das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft trugen entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei. Allen Mitarbeitern am Institut für Genetik sei dafür gedankt.

Der heutige Tag ist
ein Resultat des gestrigen.
Was dieser gewollt hat,
müssen wir erforschen,
wenn wir zu wissen wünschen,
was jener will.

Heinrich Heine

Curriculum vitae

Persönliches:

Name	Udo Krause-Buchholz, geb. Krause
Adresse	Hubertusstrasse 43 01129 Dresden
Geburtsdatum	25.11.1970
Familienstand	verheiratet, 1 Kind

Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang:

1977-1987	10-Klassen-Schule in Dresden
1987-1989	12-Klassen erweiterte Oberschule in Dresden
09/1990-09/1995	Studium der Biologie an der Universität Potsdam
01/1994-03/1994	Forschungsaufenthalt am Royal Hospital of Aberdeen, Department of Microbiology
seit 11/1995	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik, TU-Dresden
02/1996-08/1996	Forschungsaufenthalt am Hans-Knöll-Institut in Jena, Abteilung für molekulare Genetik

Militär- und alternativer Dienst:

09/1989-05/1990	Militärdienst
05/1990-09/1990	Zivildienst im Bereich Naturschutz

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik der TU Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. G. Rödel angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 11. Juli 2000

Udo Krause-Buchholz

